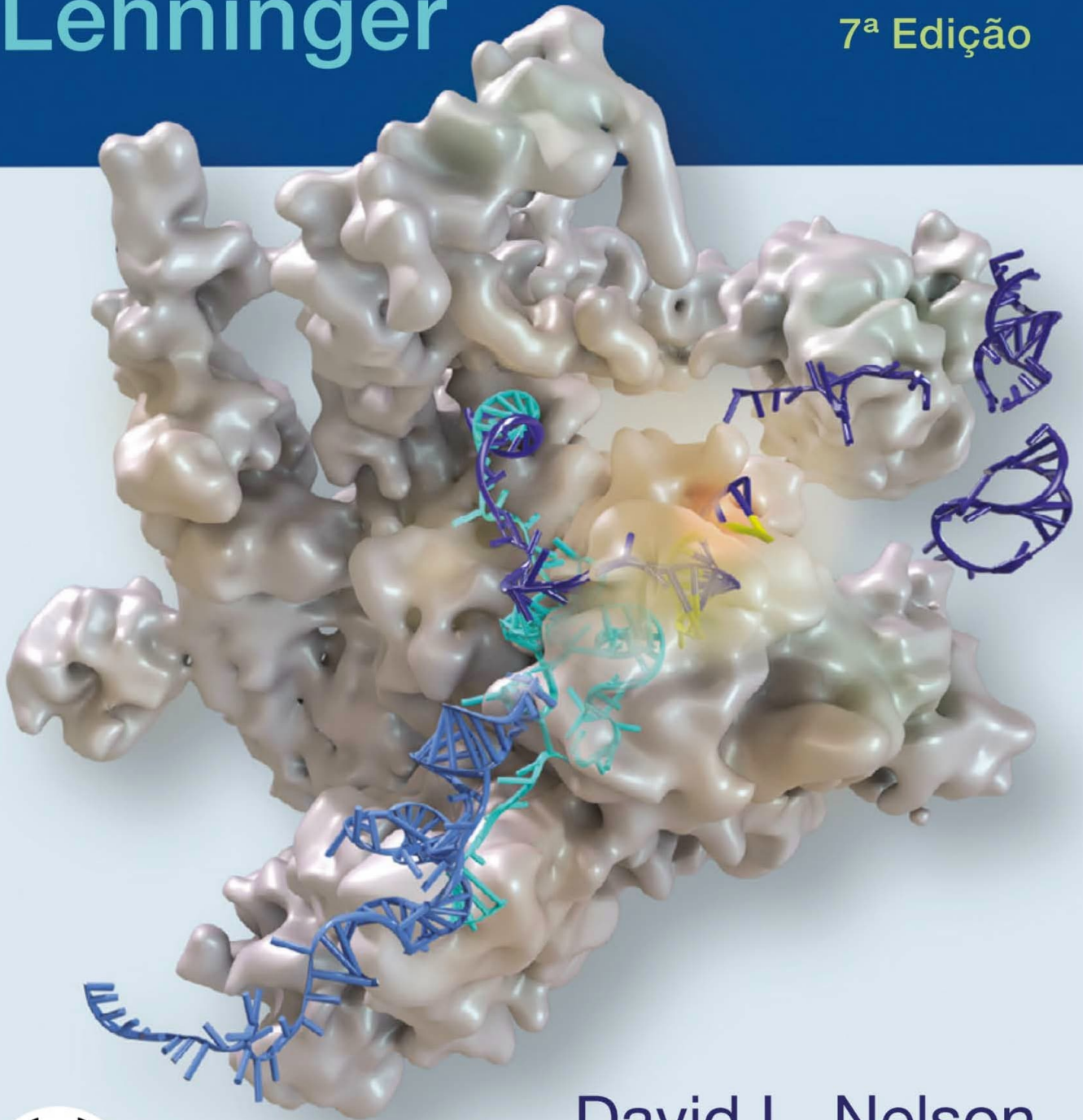


PRINCÍPIOS *de* BIOQUÍMICA *de* Lehninger

7ª Edição



David L. Nelson
Michael M. Cox



N425p Nelson, David L.
Princípios de bioquímica de Lehninger [recurso eletrônico]
/ David L. Nelson, Michael M. Cox ; tradução: Carla Dalmaz,
Carlos Termignoni, Maria Luiza Saraiva Pereira ; revisão
técnica: Carla Dalmaz, Carlos Termignoni, Maria Luiza
Saraiva Pereira. – 7. ed. – Porto Alegre : Artmed, 2019.

Editado também como livro impresso em 2019.
ISBN 978-85-8271-534-5

1. Bioquímica. I. Cox, Michael M. II. Título.

CDU 577

David L. Nelson

*Professor Emeritus of Biochemistry
University of Wisconsin-Madison*

Michael M. Cox

*Professor of Biochemistry
University of Wisconsin-Madison*

PRINCÍPIOS *de* BIOQUÍMICA *de* Lehninger

7ª Edição

Tradução:

Carla Dalmaz (*Iniciais, Capítulos 7, 10, 14 a 21, Glossário, Índice*)

Carlos Termignoni (*Capítulos 1 a 6, 11 a 13, Índice*)

Maria Luiza Saraiva Pereira (*Capítulos 8, 9, 22 a 28, Índice*)

Revisão técnica:

Carla Dalmaz

Professora associada do Departamento de Bioquímica,
Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).
Doutora em Bioquímica pela Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Carlos Termignoni

Professor associado do Centro de Biotecnologia do Departamento de Bioquímica da UFRGS.
Doutor em Biologia Molecular pela Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (EPM-Unifesp).

Maria Luiza Saraiva Pereira

Professora associada do Departamento de Bioquímica da UFRGS.
Doutora em Biologia Molecular pela United Medical and Dental Schools of Guy's and
St Thomas's Hospitals, London University, Reino Unido.

Versão impressa
desta obra: 2019



2019

Obra originalmente publicada sob o título *Lehninger principles of biochemistry*, 7th edition

ISBN 9781464126116

First published in the United States by W.H. Freeman and Company.

Copyright © 2017, 2013, 2008, 2005 by W.H. Freeman and Company. All Rights Reserved. Todos os direitos reservados.

Gerente editorial: *Letícia Bispo de Lima*

Colaboraram nesta edição:

Editora: *Simone de Fraga*

Preparação de originais: *Marquieli de Oliveira*

Leitura final: *Daniela de Freitas Louzada*

Arte sobre capa original: *Márcio Monticelli*

(*Capa*: um espliceossomo ativo da levedura *Schizosaccharomyces pombe*. A estrutura, determinada por microscopia crio-eletrônica, captura um momento molecular em que a reação de corte-junção está quase completa. Ela inclui os snRNA U2, U5 e U6, um íntron lariat clivado e muitas proteínas associadas. A estrutura foi determinada por Yigong Shi e colaboradores, da Universidade Tsinghua, Pequim, China (PDB ID 3JB9, C. Yan et al., *Science* 349:1182, 2015). *Contracapa*: partículas de espliceossomos individuais, depositadas aleatoriamente, vistas por microscopia eletrônica. A estrutura observada na capa foi obtida encontrando-se, por meios computacionais, as orientações que podem ser superpostas, de modo a reduzir o ruído e reforçar o sinal – a estrutura do espliceossomo. Foto por cortesia de Yigong Shi.)

Editoração: *Clic Editoração Eletrônica Ltda.*

NOTA

Assim como a medicina, a bioquímica é uma ciência em constante evolução. À medida que novas pesquisas e a própria experiência clínica ampliam o nosso conhecimento, são necessárias modificações na terapêutica, onde também se insere o uso de medicamentos. Os autores desta obra consultaram as fontes consideradas confiáveis, num esforço para oferecer informações completas e, geralmente, de acordo com os padrões aceitos à época da publicação. Entretanto, tendo em vista a possibilidade de falha humana ou de alterações nas ciências médicas, os leitores devem confirmar estas informações com outras fontes. Por exemplo, e em particular, os leitores são aconselhados a conferir a bula completa de qualquer medicamento que pretendam administrar, para se certificar de que a informação contida neste livro está correta e de que não houve alteração na dose recomendada nem nas precauções e contraindicações para o seu uso. Essa recomendação é particularmente importante em relação a medicamentos introduzidos recentemente no mercado farmacêutico ou raramente utilizados.

Reservados todos os direitos de publicação, em língua portuguesa, à
ARTMED EDITORA LTDA., uma empresa do GRUPO A EDUCAÇÃO S.A.

Av. Jerônimo de Ornelas, 670 – Santana

90040-340 Porto Alegre RS

Fone: (51) 3027-7000 Fax: (51) 3027-7070

Unidade São Paulo

Rua Doutor Cesário Mota Jr., 63 – Vila Buarque

01221-020 São Paulo SP

Fone: (11) 3221-9033

SAC 0800 703-3444 – www.grupoa.com.br

É proibida a duplicação ou reprodução deste volume, no todo ou em parte, sob quaisquer formas ou por quaisquer meios (eletrônico, mecânico, gravação, fotocópia, distribuição na Web e outros), sem permissão expressa da Editora.

Para nossos professores

Paul R. Burton

Albert Finholt

William P. Jencks

Eugene P. Kennedy

Homer Knoss

Arthur Kornberg

I. Robert Lehman

Earl K. Nelson

Wesley A. Pearson

David E. Sheppard

Harold B. White

Esta página foi deixada em branco intencionalmente.

Os autores

David L. Nelson, nascido em Fairmont, Minnesota, formou-se em Química e Biologia no St. Olaf College, em 1964, e obteve o Doutorado em Bioquímica pela Stanford Medical School sob a orientação de Arthur Kornberg. Realizou Pós-doutorado na Harvard Medical School sob a supervisão de Eugene P. Kennedy, um dos primeiros estudantes formados por Albert Lehninger. Em 1971, Nelson ingressou na Universidade de Wisconsin-Madison, tornando-se professor titular de bioquímica em 1982. Por oito anos, foi diretor do Center for Biology Education, na Universidade de Wisconsin-Madison. Tornou-se professor emérito em 2013.

O trabalho de pesquisa de Nelson está centrado nas transduções de sinal que regulam o movimento ciliar e a excitose no protozoário *Paramecium*. Distingue-se como conferencista e supervisor em atividades de pesquisa. Por 43 anos, lecionou (com Mike Cox) em um curso intensivo de bioquímica avançada para estudantes de graduação em ciências da vida. Também ministrou cursos de bioquímica para estudantes de enfermagem, bem como disciplinas de graduação em estrutura e função de membranas e em neurobiologia molecular. Recebeu prêmios por sua excelência como professor, incluindo o prêmio por ensino acadêmico Dreyfus Teacher-Scholar, o prêmio Atwood por distinção como professor e o prêmio Underkofer por excelência no ensino, do Sistema da Universidade de Wisconsin. Entre 1991 e 1992, foi professor visitante de química e biologia no Spelman College.

O segundo amor de Nelson é a história, e razão pela qual agora ensina história da bioquímica e coleciona instrumentos científicos antigos para exposição no Museu de Ciências de Madison, do qual foi fundador e é presidente.

Michael M. Cox nasceu em Wilmington, Delaware. No seu primeiro curso de bioquímica, o livro *Bioquímica*, de Lehninger, em sua 1ª edição, teve grande influência no redirecionamento do seu fascínio pela biologia e o inspirou a seguir a carreira de bioquímico. Depois da graduação pela Universidade de Delaware, em 1974, Cox ingressou na Universidade Brandeis, onde realizou Doutorado com William P. Jencks. Partiu então para Stanford, em 1979, para fazer o Pós-doutorado com I. Robert Lehman. Ingressou na Universidade de Wisconsin-Madison em 1983 tornando-se professor titular de bioquímica em 1992.

A tese de Doutorado de Cox foi sobre a catálise geral acidobásica como modelo para as reações catalisadas por enzimas. Em Stanford, começou a trabalhar com as enzimas envolvidas na recombinação genética. O trabalho enfocava principalmente a proteína RecA – com o desenvolvimento de métodos de purificação e ensaios que ainda estão em uso – e o esclarecimento do processo de migração de ramificação do DNA em uma junção de Holliday. O estudo das en-



David L. Nelson e Michael M. Cox.

Fonte: Robin Davies, UW-Madison Biochemistry MediaLab.

zimas da recombinação genética permanece o tema central de sua pesquisa.

Michael Cox coordena um grande e ativo grupo de pesquisa em Wisconsin, investigando a enzimologia, a topologia e a energética do reparo do DNA recombinante de quebras da dupla-fita no DNA. O trabalho tem sido centrado na proteína RecA de bactérias, um amplo espectro de proteínas que desempenham papéis auxiliares no reparo do DNA recombinante, as bases moleculares da resistência extrema à radiação ionizante, a evolução dirigida de novos fenótipos em bactérias e aplicações de todo esse trabalho na biotecnologia.

Ao longo de 30 anos, Cox tem lecionado em cursos de bioquímica para estudantes de graduação, além de ministrar cursos de estrutura e topologia de DNA, interações DNA-proteína, bioquímica da recombinação em cursos de pós-graduação. Seus projetos mais recentes consistem na organização de um novo curso sobre responsabilidade profissional para estudantes do primeiro ano da Pós-graduação e o estabelecimento de um programa sistemático para atrair estudantes talentosos em estágio inicial de suas carreiras universitárias para o laboratório de bioquímica. Recebeu prêmios por suas atividades tanto de ensino como de pesquisa, incluindo o Prêmio Dreyfus Teacher-Scholar, o Prêmio Eli Lilly em química biológica, em 1989, e, em 2009, o Prêmio Regents por excelência no ensino, da Universidade de Wisconsin. Ele é também muito ativo nos esforços nacionais para prover novas diretrizes para a educação em bioquímica na graduação.

Seus *hobbies* incluem transformar 18 acres de uma fazenda no Wisconsin em um arboreto, colecionar vinhos e participar de projetos de prédios de laboratórios.

Esta página foi deixada em branco intencionalmente.

Sobre a natureza da ciência

No século XXI, a educação científica com frequência deixa de lado o suporte filosófico da ciência ou confia em definições simplificadas demais. Se você pretende seguir uma carreira em ciências, pode ser útil considerar uma vez mais os termos **ciência**, **cientista** e **método científico**.

Ciência é tanto um modo de pensar sobre o mundo natural como a soma das teorias e das informações que resultam desse pensamento. O poder e o sucesso da ciência resultam diretamente da confiança em ideias que podem ser testadas: informações sobre fenômenos naturais que podem ser observados, medidos e reproduzidos, além de teorias que têm valor prognóstico. O progresso da ciência se baseia em uma suposição fundamental muitas vezes não explícita, mas crucial para a empreitada: a de que as leis que governam as forças e os fenômenos existentes no universo não estão sujeitas a mudanças. O ganhador do Prêmio Nobel Jacques Monod referiu-se a essa suposição como o “postulado da objetividade”. O mundo natural, portanto, pode ser compreendido aplicando-se um processo de questionamento – o método científico. A ciência não poderia ter sucesso em um universo que nos pregasse peças. A não ser pelo postulado da objetividade, não há outra afirmativa inviolável sobre o mundo natural que a ciência faça. Uma ideia científica útil é aquela (1) que tenha sido ou possa ser mensurada de maneira reproduzível (2), que possa ser utilizada para prever novos fenômenos de maneira precisa e (3) que focalize o mundo ou o universo natural.

As ideias científicas podem assumir muitas formas. Os termos que os cientistas utilizam para descrevê-las têm significados bem diferentes daqueles aplicados por não cientistas. Uma *hipótese* é uma ideia ou afirmação que fornece uma explicação razoável e testável para uma ou mais observações, mas talvez não tenha ampla comprovação experimental. Uma *teoria científica* é muito mais do que um palpite. É uma ideia comprovada até certo ponto e que fornece uma explicação para um corpo de observações experimentais. Uma teoria pode ser testada e desenvolvida, constituindo, assim, uma base para avanços e inovações. Quando uma teoria científica é repetidamente testada e validada em várias frentes, pode ser aceita como fato.

É importante ressaltar que o que constitui a ciência ou uma ideia científica se define pelo fato de ser ou não publicado na literatura após ter sido revisado por outros cientistas. Até o fim de 2014, cerca de 34.500 revistas científicas revisadas por cientistas publicaram, no mundo todo, por volta de 2,5 milhões de artigos a cada ano, uma rica e contínua safra de informações que é patrimônio de todo ser humano.

Os **cientistas** são indivíduos que aplicam rigorosamente o método científico para compreender o mundo natural. O fato de ser graduado em determinada disciplina não torna a pessoa um cientista, nem a falta de tal graduação impede que alguém faça importantes contribuições científicas. Um cientista precisa ter o ímpeto de desafiar uma ideia quando novos achados o exigem. As ideias que um cientista aceita devem ser fundamentadas em observações reproduzíveis e mensuráveis, e ele deve relatar essas observações com total honestidade.

O **método científico** é, na verdade, uma coleção de caminhos, todos podendo levar a uma descoberta científica. No caminho da *hipótese e experimentação*, o cientista levanta uma hipótese e a submete a um teste experimental. Muitos processos com os quais os bioquímicos trabalham todos os dias foram descobertos dessa maneira. A estrutura do DNA, elucidada por James Watson e Francis Crick, levou à hipótese de que os pares de bases constituíam a base para a transferência de informações na síntese de polinucleotídeos. Essa hipótese ajudou a inspirar a descoberta da DNA-polimerase e da RNA-polimerase.

Watson e Crick propuseram sua estrutura do DNA por meio de um processo de *construção de modelo e cálculo*. Não houve experimento real envolvido, embora a construção do modelo e os cálculos realizados tenham utilizado dados coletados por outros cientistas. Muitos cientistas aventureiros aplicaram o processo de *exploração e observação* como um caminho para a descoberta. Viagens históricas de descoberta (entre elas a de Charles Darwin no H.M.S. *Beagle*, em 1831) ajudaram no mapeamento do planeta, na catalogação dos seres vivos e modificaram a forma como encaramos o mundo. Os cientistas modernos seguem um caminho semelhante quando exploram as profundezas do oceano ou lançam sondas para outros planetas. Um processo análogo ao da hipótese e experimentação é o da *hipótese e dedução*. Crick pensou que deveria existir uma molécula adaptadora que facilitasse a tradução da informação do RNA mensageiro em proteína. Essa hipótese do adaptador levou à descoberta do RNA transportador por Mahlon Hoagland e Paul Zamecnik.

Nem todos os caminhos para a descoberta envolvem planejamento – com frequência, a *casualidade* também tem um papel. A descoberta da penicilina por Alexander Fleming, em 1928, e dos RNA catalisadores por Thomas Cech, no início dos anos 1980, foram duas descobertas feitas por acaso, embora alcançadas por cientistas bem preparados para investigá-las. A *inspiração* também pode levar a importantes avanços. A reação em cadeia da polimerase (PCR), que atualmente constitui parte central da biotecnologia, foi desenvolvida por Kary Mullis, em 1983, após um momento de inspiração durante uma viagem pelo norte da Califórnia.

Esses diversos caminhos que levam à descoberta científica podem parecer um tanto diferentes, mas têm importantes aspectos em comum. Eles se concentram no mundo natural e têm base na *observação* e/ou *experimentação reproduzíveis*. Todas as ideias, palpites e fatos experimentais que se originam dessas empreitadas podem ser testados e reproduzidos por cientistas em qualquer lugar do mundo. Todos podem ser utilizados por outros cientistas para construir novas hipóteses e fazer novas descobertas. Todos levam à informação, que é incluída apropriadamente no mundo da ciência. A compreensão do universo requer trabalho árduo. Ao mesmo tempo, nenhuma jornada humana é mais empolgante e potencialmente recompensadora do que a tentativa, às vezes bem-sucedida, de compreender parte do mundo natural.

Esta página foi deixada em branco intencionalmente.

Prefácio

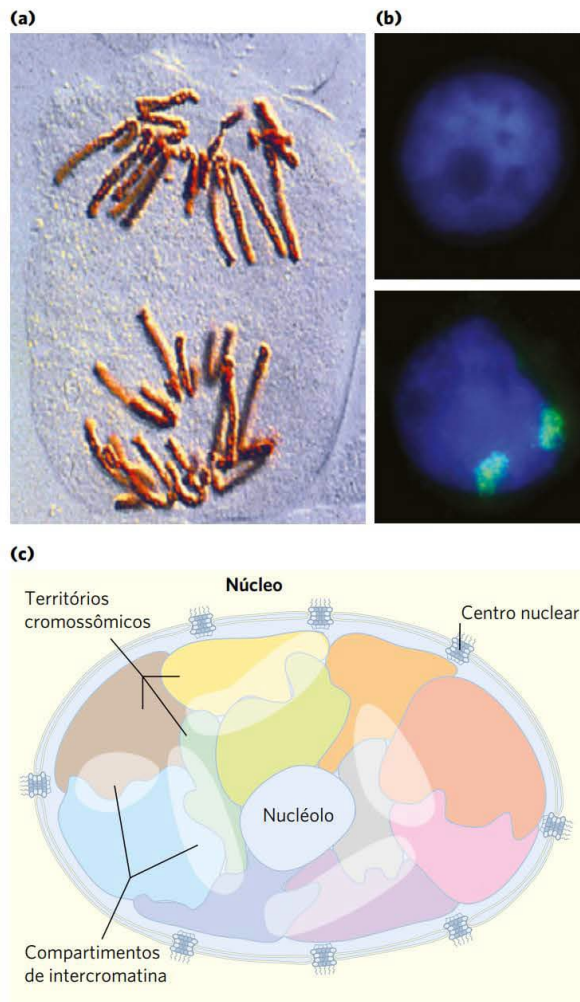
Com o advento de tecnologias cada vez mais desenvolvidas, que propiciam o estudo de processos moleculares a partir de uma abordagem celular e do organismo como um todo, o progresso na bioquímica continua avançando, fornecendo tanto novas surpresas quanto novos desafios. A imagem em nossa capa mostra um espliceossomo ativo, uma das maiores máquinas moleculares em uma célula eucariótica e que apenas agora está mostrando seus segredos estruturais à análise moderna. É um exemplo de nossa atual compreensão da vida no nível da estrutura molecular. A imagem é como uma fotografia de um momento em um conjunto altamente complexo de reações, focalizado de modo como nunca foi possível. Na célula, contudo, este é apenas um de muitos passos unidos espacial e temporalmente a muitos outros processos complexos que seguem não compreendidos e devem ser descortinados e, por fim, descritos em futuras edições. Nosso objetivo nesta 7ª edição do *Princípios de bioquímica de Lehninger*, como sempre, é atingir um equilíbrio: incluir achados de pesquisa novos e excitantes sem tornar o livro pesado para os estudantes. O principal critério empregado para a inclusão de um avanço é que os novos achados ajudem a ilustrar um importante princípio da bioquímica.

Em cada edição deste livro, buscamos manter a qualidade que tornou o texto original de Lehninger um clássico, com explicações úteis para conceitos complexos e a comunicação esclarecedora aos estudantes sobre os meios pelos quais a bioquímica é entendida e praticada hoje. Somos co-autores deste livro e lecionamos juntos em cursos de introdução à bioquímica por três décadas. Nossos milhares de alunos na Universidade de Wisconsin-Madison têm sido, ao longo desses anos, uma contínua fonte de ideias de como apresentar a bioquímica de forma mais clara. Esperamos que esta 7ª edição do *Lehninger* possa, por sua vez, esclarecer a bioquímica para novos estudantes no mundo todo, inspirando-os a amar a bioquímica como amamos.

NOVO Ciência de vanguarda

Entre os tópicos novos ou substancialmente atualizados nesta edição, estão:

- Células sintéticas e doenças genômicas (Capítulo 1)
- Segmentos proteicos intrinsecamente desorganizados (Capítulo 4) e sua importância na sinalização (Capítulo 12)
- Cinética enzimática pré-estado estacionário (Capítulo 6)
- Anotação gênica (Capítulo 9)
- Edição gênica com CRISPR (Capítulo 9)
- Tráfego e dinâmica de membranas (Capítulo 11)
- Papéis adicionais do NADH (Capítulo 13)
- Complexo da celulose-sintase (Capítulo 20)



Organização cromossômica no núcleo eucariótico

Fotos: (a) Pr. G. Giménez-Martín/Science Source. (b) Karen Meaburn e Tom Misteli/National Cancer Institute.

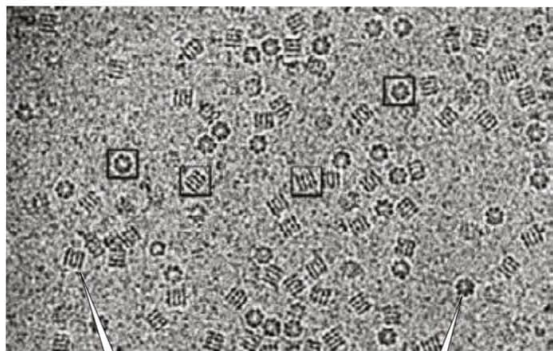
- Mediadores especializados pró-resolução (Capítulo 21)
- Hormônios peptídicos: incretinas e glicemia; irisina e exercício (Capítulo 23)
- Territórios cromossômicos (Capítulo 24)
- Novos detalhes da replicação do DNA em eucariotos (Capítulo 25)
- Arrebatando o Cap; estrutura do espliceossomo (Capítulo 26)
- Resgate de ribossomos; atualização na edição do RNA (Capítulo 27)
- Novos papéis para RNA não codificantes (Capítulos 26, 28)
- Motivo de reconhecimento do RNA (Capítulo 28)

NOVO Ferramentas e tecnologias

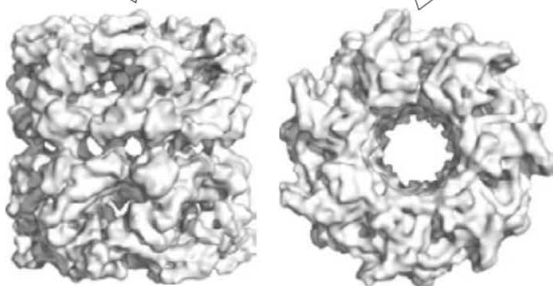
As novas ferramentas da biologia de sistemas continuam a transformar nossa compreensão da bioquímica. Elas incluem tanto novas técnicas de laboratório como grandes bancos de dados públicos que se tornaram indispensáveis aos pesquisadores. Novidades nesta edição do *Princípios de bioquímica de Lehninger*:

- O sequenciamento de DNA de nova geração agora inclui sequenciamento semicondutor iônico (Íon Torrent) e plataformas de sequenciamento de molécula única em tempo real (SMRT), e a discussão no texto agora segue a descrição do sequenciamento clássico de Sanger (Capítulo 8).
- Edição gênica por CRISPR é uma das muitas atualizações na discussão da genômica (Capítulo 9).
- Banco de dados com mapas de lipídeos (LIPID MAPS) e sistema de classificação de lipídeos estão incluídos na discussão de lipidômica (Capítulo 10).
- A microscopia crioelétrica está descrita em um novo quadro (Capítulo 19).
- Perfil ribossômico para determinar quais genes estão sendo traduzidos em um dado momento e muitas tecnologias relacionadas estão incluídos para ilustrar a versatilidade e o poder do sequenciamento profundo do DNA (Capítulo 27).

(a)



(b)



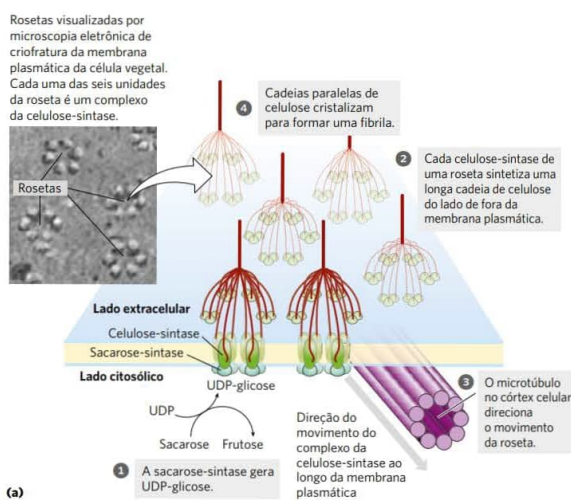
Estrutura da proteína chaperona GroEL, determinada por microscopia crioelétrica

Foto: © Alberto Bartesaghi, PhD.

- Recursos com dados *online*, como NCBI, PDB, SCOP2, KEGG e BLAST, mencionados no texto, estão listados no final para fácil referência.

NOVO Consolidação do metabolismo em plantas

Todo o metabolismo em plantas está agora consolidado em um único capítulo, o Capítulo 20, separado da discussão da fosforilação oxidativa, no Capítulo 19. O Capítulo 20 inclui síntese de ATP com energia da luz, fixação de carbono, fotorrespiração, ciclo do glioxilato, síntese de amido e celulose e mecanismos de regulação que asseguram a integração de todas essas atividades na planta.



(a)

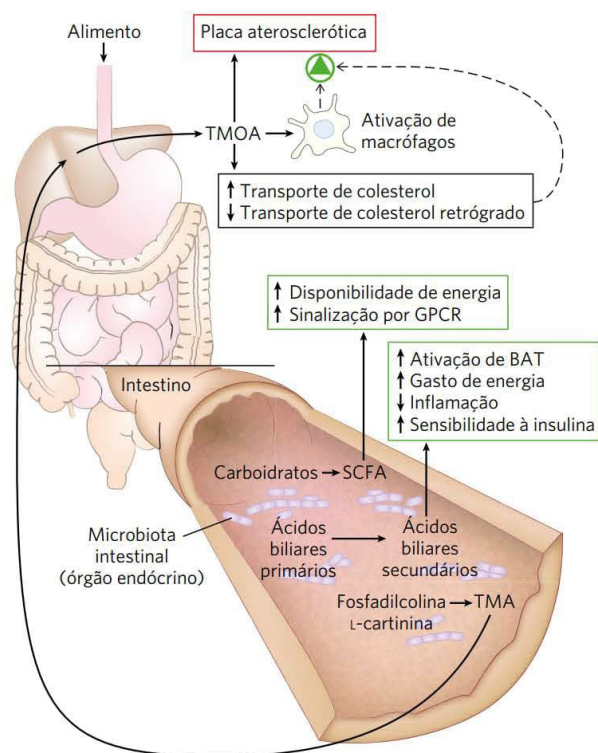
Foto: © Cortesia do Dr. Candace H. Haigler, North Carolina State University e do Dr. Mark Grimson, Texas Tech University.

Ideias e aplicações na medicina



Este ícone é utilizado em todo o livro para indicar temas de interesse clínico. Como professores, nosso objetivo é que os estudantes aprendam a bioquímica e compreendam sua relevância para uma vida e um planeta mais saudáveis. Muitas seções investigam o que sabemos sobre os mecanismos moleculares das doenças. Os tópicos clínicos novos e atualizados nesta edição são:

- **ATUALIZADO** Lactase e intolerância à lactose (Capítulo 7)
- **NOVO** Síndrome de Guillain-Barré e gangliosídeos (Capítulo 10)
- **NOVO** Projeto *Golden Rice* para prevenir doenças por deficiência de vitamina A (Capítulo 10)
- **ATUALIZADO** Transportadores relacionados à resistência a multifármacos e sua importância na medicina clínica (Capítulo 11)
- **NOVO** Vislumbres da fibrose cística e seu tratamento (Capítulo 11)



Efeitos do metabolismo da microbiota intestinal sobre a saúde

- **ATUALIZADO** Câncer colorretal: progressão em muitas etapas (Capítulo 12)
- **NOVO** Varredura neonatal para acil-carnitina para diagnóstico de doenças mitocondriais (Capítulo 17)
- **NOVO** Doenças mitocondriais, doação de mitocôndrias e “bebês com três genitores” (Capítulo 19)
- **ATUALIZADO** Metabolismo do colesterol, formação de placas e aterosclerose (Capítulo 21)
- **ATUALIZADO** Enzimas citocromo P-450 e interações com fármacos (Capítulo 21)
- **ATUALIZADO** Toxicidade da amônia no encéfalo (Capítulo 22)
- **NOVO** Xenobióticos e perturbação endócrina (Capítulo 23)

Tópico especial: integração metabólica, obesidade e diabetes

A obesidade e seu impacto na saúde, incluindo doença cardiovascular e diabetes, estão rapidamente se tornando uma epidemia no mundo industrializado: assim, entremeando toda esta edição, incluímos informações novas acerca das conexões bioquímicas entre obesidade e saúde. O diabetes é o tema integrador ao longo dos capítulos que tratam do

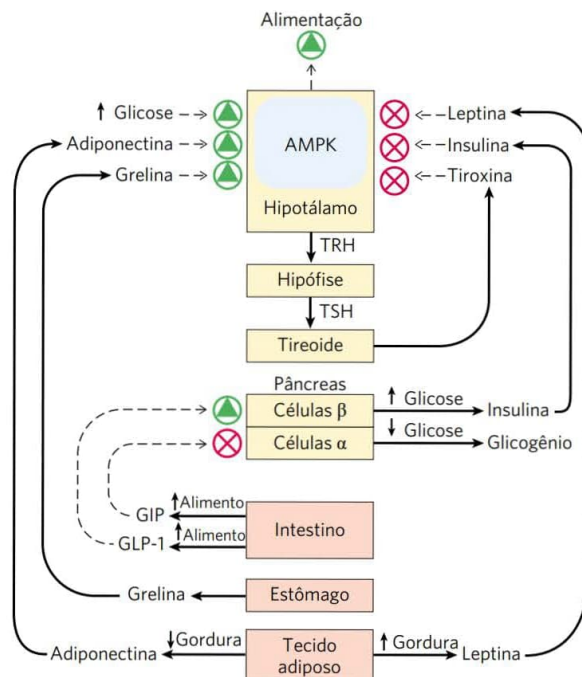
metabolismo e seu controle. Alguns dos tópicos que ajudam a esclarecer as interações entre metabolismo, obesidade e diabetes são:

- Acidose no diabetes não tratado (Capítulo 2)
- Dobramento defeituoso de proteínas, deposição amiloide no pâncreas e diabetes (Capítulo 4)
- **ATUALIZADO** Glicemia e hemoglobina glicada no diagnóstico e no tratamento do diabetes (Quadro 7-1)
- Produtos de glicação avançada (AGE): seu papel na patologia do diabetes avançado (Quadro 7-1)
- Transportadores defeituosos de glicose e de água nas duas formas de diabetes (Quadro 11-1)
- **NOVO** Cotransportador de Na^+ -glicose e a utilização de gliflozinas no tratamento do diabetes tipo 2 (Capítulo 11)
- Deficiência na captação de glicose no diabetes tipo 1 (Capítulo 14)
- MODY: uma forma rara de diabetes (Quadro 15-3)
- Superprodução de corpos cetônicos no diabetes e no jejum prolongado (Capítulo 17)
- **NOVO** Degradação de aminoácidos: metilglioxal como um fator para o diabetes tipo 2 (Capítulo 18)
- Uma forma rara de diabetes resultante de defeitos nas mitocôndrias das células β -pancreáticas (Capítulo 19)
- Gliceroneogênese estimulada por tiazolidinediona no diabetes tipo 2 (Capítulo 21)
- Papel da insulina na oposição à alta glicemia (Capítulo 23)
- Secreção de insulina por células β -pancreáticas em resposta a mudanças na glicemia (Capítulo 23)
- Como foi descoberta e purificada a insulina (Quadro 23-1)
- **NOVO** Proteínas-cinase ativadas por AMP no hipotálamo na integração de sinais hormonais originários do intestino, do músculo e do tecido adiposo (Capítulo 23)
- **ATUALIZADO** Papel do mTORC1 na regulação do crescimento celular (Capítulo 23)
- **NOVO** Tecidos adiposos marrom e bege como tecidos termogênicos (Capítulo 23)
- **NOVO** Exercício, estímulo para liberação de irisina e perda de peso (Capítulo 23)
- **NOVO** Influência da grelina, do PYY_{3-36} e dos canabinoides sobre o comportamento alimentar de curto prazo (Capítulo 23)
- **NOVO** Simbiontes microbiotas do intestino influenciando o metabolismo energético e adipogênese (Capítulo 23)
- Insensibilidade tecidual à insulina no diabetes tipo 2 (Capítulo 23)
- **ATUALIZADO** Manejo do diabetes tipo 2 com dieta, exercício, medicação e cirurgia (Capítulo 23)

Tópico especial: evolução

Cada vez que um(a) bioquímico(a) estuda uma via de desenvolvimento em nematódeos, identifica partes essenciais do centro ativo de uma enzima pela determinação de quais partes são conservadas entre as espécies ou procura o gene responsável por uma doença genética humana, ele(a) está usando como base a teoria da evolução. Agências de fomento dão apoio a trabalhos com nematódeos com a expectativa de que as informações obtidas terão também relevância para os seres humanos. A conservação de resíduos funcionais no sítio ativo de uma enzima transmite a história que cada organismo compartilha no planeta. Com frequência, a procura por um gene responsável por uma doença é um exercício sofisticado de filogenética. A evolução é, portanto, um conceito fundamental para nossa disciplina de bioquímica. Algumas das várias áreas que discutem bioquímica a partir de um ponto de vista evolutivo:

- Alterações nas instruções hereditárias que permitem a evolução (Capítulo 1)
- Origens das biomoléculas na evolução química (Capítulo 1)
- RNA ou precursores de RNA como os primeiros genes e primeiros catalisadores (Capítulos 1, 26)
- Cronograma da evolução biológica (Capítulo 1)
- Uso de combustíveis inorgânicos por células primitivas (Capítulo 1)
- Evolução dos eucariotos a partir de células mais simples (teoria endossimbiótica) (Capítulos 1, 19, 20)
- Sequências de proteínas e árvores evolutivas (Capítulo 3)
- Papel da teoria da evolução em comparações de estruturas de proteínas (Capítulo 4)
- Evolução da resistência a antibióticos em bactérias (Capítulo 6)
- Explicação evolutiva para o fato de nucleotídeos da adenina serem componentes de muitas coenzimas (Capítulo 8)
- Genômica comparativa e evolução humana (Capítulo 9)
- Usando a genômica para entender a ascendência Neanderthal (Quadro 9-3)
- Relações evolutivas entre ATPases do tipo V e do tipo F (Capítulo 11)
- Características universais dos sistemas de receptores acoplados a proteínas G (Capítulo 12)
- Divergência evolutiva das enzimas da β -oxidação (Capítulo 17)
- Evolução da fotossíntese oxigênica (Capítulo 20)
- **NOVO** Presença de organelas, incluindo núcleos, em bactérias de planctomicetos (Quadro 22-1)
- Papel dos transposons na evolução do sistema imune (Capítulo 25)
- Origem evolutiva comum de transposons, retrovírus e íntrons (Capítulo 26)



Regulação do comportamento alimentar

- Discussão consolidada da hipótese do mundo do RNA (Capítulo 26)
- Variações naturais no código genético – exceções que provam a regra (Quadro 27-1)
- Expansões naturais e experimentais do código genético (Quadro 27-2)
- Genes reguladores no desenvolvimento e na especiação (Quadro 28-1)

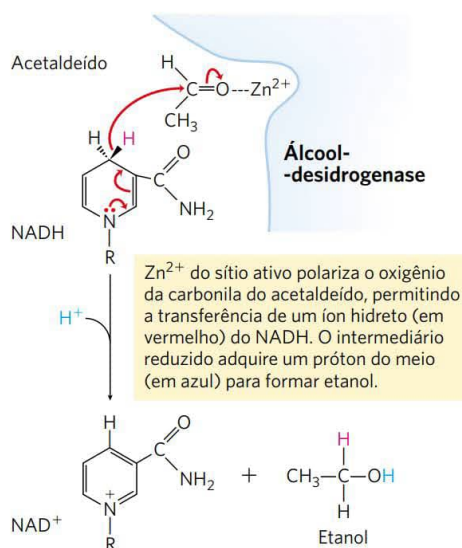
Marcas no ensino de Lehninger

Os estudantes que pela primeira vez entram em contato com a bioquímica frequentemente têm dificuldades com dois aspectos-chave da disciplina: abordar problemas quantitativos e recorrer aos seus conhecimentos de química orgânica para entender bioquímica. Eles também devem aprender uma linguagem complexa, com convenções que, em geral, não são apresentadas. Para ajudar os estudantes a lidarem com esses desafios, são fornecidos os seguintes auxílios para o estudo.

Foco em lógica química

- A Seção 13.2, **Lógica química e reações bioquímicas comuns**, discute os tipos comuns de reações bioquímicas que fundamentam todas as reações metabólicas, ajudando os estudantes a conectar a química orgânica com a bioquímica.

- **Figuras de lógica química** ressaltam a conservação dos mecanismos e ilustram os padrões que tornam mais fácil o aprendizado das vias. As figuras de lógica química são fornecidas para cada uma das vias metabólicas centrais, incluindo a glicólise (Figura 14-3), o ciclo do ácido cítrico (Figura 16-7) e a oxidação dos ácidos graxos (Figura 17-9).
- **Figuras de mecanismos** expõem descrições passo a passo para ajudar os estudantes a entender o processo das reações. Essas figuras usam um conjunto consistente de convenções introduzidas e explicadas em detalhes junto com o primeiro mecanismo enzimático descrito (quimotripsina, Figura 6-23).
- **Leituras adicionais** Estudantes e professores podem descobrir mais sobre os tópicos no texto na lista de Leituras adicionais em cada capítulo. Cada lista cita revisões acessíveis, artigos clássicos e artigos de pesquisa que ajudarão os usuários a mergulhar mais profundamente tanto na história quanto no estado atual da bioquímica.

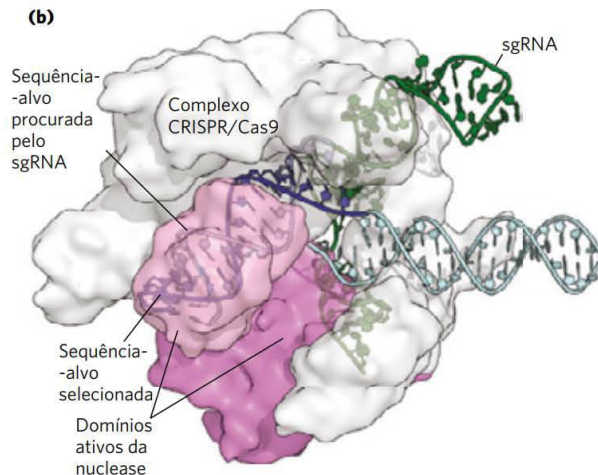


Mecanismo de reação para a álcool-desidrogenase

Clareza da arte

- **Interpretações mais inteligentes de figuras clássicas** são mais fáceis de compreender.
- **Estruturas moleculares** foram criadas especificamente para este livro, usando formas e esquemas de cores harmônicos.
- Figuras com **etapas numeradas e com notas** ajudam a explicar processos complexos.
- **Figuras de resumos** ajudam os estudantes a manter em mente o quadro geral enquanto aprendem os detalhes.

(b)



Estrutura de CRISPR/Cas9

Ferramentas para resolução de problemas

- **Exemplos de problemas resolvidos incluídos no texto** ajudam os estudantes a aumentarem sua capacidade de resolver problemas quantitativos, revendo algumas das equações mais difíceis.
- **Mais de 600 problemas nos finais dos capítulos** dão aos estudantes novas oportunidades para praticar o que aprenderam.
- **Problemas de análise de dados** (um no final de cada capítulo), elaborados por Brian White, da Massachusetts University de Boston, encorajam os estudantes a fazer uma síntese daquilo que aprenderam e a aplicar seus conhecimentos na interpretação de dados da pesquisa na literatura.

Convenções-chave

Muitas das convenções tão necessárias para a compreensão de cada tópico bioquímico e da literatura bioquímica estão destacadas. Estas **convenções-chave** incluem enunciados claros sobre muitas hipóteses e convenções que se espera que os alunos saibam, mas muitas vezes ninguém os informa a respeito (p. ex., as sequências peptídicas são escritas da extremidade amino para a extremidade carboxila, da esquerda para a direita; as sequências nucleotídicas são escritas da extremidade 5' para a 3', da esquerda para a direita).

Material complementar

O professor interessado em recursos pedagógicos complementares deve acessar o site do Grupo A (loja.grupoa.com.br), fazer o seu cadastro, buscar pela página do livro e localizar a área de Material Complementar para ter acesso às imagens selecionadas em formato de PowerPoints®.

Esta página foi deixada em branco intencionalmente.

Agradecimentos

Este livro é resultado de um esforço conjunto, e sua produção seria impossível sem a equipe da W. H. Freeman, que nos apoiou em todas as etapas. Susan Moran, editora sênior de desenvolvimento, e Lauren Schultz, editora executiva, ajudaram a desenvolver o plano de revisão para esta edição, fizeram muitas sugestões úteis, encorajaram-nos e tentaram valentemente (nem sempre com sucesso) nos manter no cronograma previsto. Nossa excepcional editora de projetos, Liz Geller, mostrou paciência notável à medida que regularmente falhávamos em satisfazer seus prazos. Agradecemos à gerente de *design*, Blake Logan, pela parte visual no *layout* do texto para o livro. Agradecemos o pesquisador de fotografia, Roger Feldman, e a editora de fotografia, Christine Buese, por sua ajuda na localização de imagens e na obtenção de permissão para usá-las, e a Shannon Moloney por sua ajuda em orquestrar revisões e muitas vezes fornecer assistência administrativa. Também agradecemos a Lori Stover, editora de mídia, Amanda Nietzel, diretora de mídia e avaliação, e Elaine Palucki, conselheira sênior em tecnologia educacional, por vislumbrarem e supervisionarem os cada vez mais importantes componentes de mídia que funcionam como material suplementar ao texto. Nossa gratidão também a Maureen Rachford, gerente de vendas, por coordenar as vendas e o esforço de propaganda. Também queremos agradecer a Kate Parker, cujo trabalho em edições prévias ainda está visível nesta edição. Em Madison, Brook Soltvedt é (e tem sido em todas as edições nas quais trabalhamos) nossa editora e crítica de primeira linha. Ela é a primeira a ver os originais dos capítulos, ajuda na escrita e no desenvolvimento das ilustrações, garante consistência interna ao conteúdo e à nomenclatura e mantém nosso desafio, incitando-nos de maneira mais ou menos gentil. A mão hábil de Linda Strange, que editou quase todas (com exceção de uma) as edições deste livro (inclusive a 1^a), está evidenciada na clareza do texto. Ela nos encorajou e inspirou com seus altos padrões científicos e literários. Como no caso das três edições prévias, Shelley Lusetti, da Universidade Estadual do Novo México, leu cada palavra do texto nas provas gráficas, detectou numerosos erros e fez muitas sugestões que aprimoraram o livro. A parte visual e os novos gráficos moleculares foram criados por Adam Steinberg, da Art for Science, que fez frequentes e valiosas sugestões, as quais levaram a ilustrações mais claras e melhores. Sentimo-nos muito felizes por termos parceiros tão talentosos como Brook, Linda, Shelley e Adam em nossa equipe.

Também estamos profundamente agradecidos a Brian White, da Universidade de Massachusetts, Boston, que escreveu as questões de análise de dados no final de cada capítulo.

Muitos outros nos auxiliaram nesta 7^a edição com seus comentários, sugestões e críticas. Somos profundamente gratos a todos eles:

Adrienne Wright, *University of Alberta*
Aime Levesque, *University of Hartford*
Alejandra Stenger, *University of Illinois at Urbana-Champaign*
Allan Scruggs, *Arizona State University*
Amanda Krzysiak, *Bellarmine University*
Amanda Sevcik, *Baylor University*

Amy Gehring, *Williams College*
Andrea Stadler, *St. Joseph's College*
Andrey Krasilnikov, *Pennsylvania State University*
Argelia Lorence, *Arkansas State University*
Blythe Janowiak, *Mulligan Saint Louis University*
Boris Steipe, *University of Toronto*
Brad Chazotte, *Campbell University College of Pharmacy & Health Sciences*
Brendan Looyenga, *Calvin College*
Brent Feske, *Armstrong State University*
Brent Nielsen, *Brigham Young University*
Brent Znosko, *Saint Louis University*
Brian Lemon, *Brigham Young University-Idaho*
Brian Sato, *University of California, Irvine*
Brooke Christian, *Appalachian State University*
Bruce Trieselmann, *Durham College*
C.-P. David Tu, *Pennsylvania State University*
Cassidy Dobson, *St. Cloud State University*
Charles Hoogstraten, *Michigan State University*
Charles Lauhon, *University of Wisconsin*
Chris Berndsen, *James Madison University*
Chuan Xiao, *University of Texas at El Paso*
Colleen Byron, *Ripon College*
Constance Jeffery, *University of Illinois at Chicago*
Cruz-Aguado Reyniel, *Douglas College*
Dan Edwards, *California State University, Chico*
David Bartley, *Adrian College*
David Casso, *San Francisco State University*
David Josephy, *University of Guelph*
Deborah Heyl-Clegg, *Eastern Michigan University*
Deborah Polayes, *George Mason University*
Diana McGill, *Northern Kentucky University*
Dmitry Kolpashchikov, *University of Central Florida*
Donald Burden, *Middle Tennessee State University*
Donald Elmore, *Wellesley College*
Donna Gosnell, *Valdosta State University*
Douglas Julin, *University of Maryland*
Douglas McAbee, *California State University, Long Beach*
Douglas Root, *University of North Texas*
Edith Osborne, *Angelo State University*
Edward Senkbei, *Salisbury University*
Elizabeth Prusak, *Bishop's University*
Emily Fisher, *Johns Hopkins University*
Emily Westover, *Brandeis University*
Enoka Wijekoon, *University of Guelph*
Francis Mann, *Winona State University*
Gary Powell, *Clemson University*
Gerry Prody, *Western Washington University*
Gerwald Jogl, *Brown University*
Gillian Rudd, *Georgia Gwinnett College*
Gopal Periyannan, *Eastern Illinois University*
Graham Moran, *University of Wisconsin-Milwaukee*
Gregory Raner, *University of North Carolina at Greensboro*
Hong Li, *Florida State University*
Ingeborg Schmidt-Krey, *Georgia Institute of Technology*
Jack Goldsmith, *University of South Carolina*
James Blankenship, *Cornell University*
James Ntambi, *University of Wisconsin-Madison*
Jamie Scaglione, *Carroll University*

Janet Kirkley, *Knox College*
 Jason Kahn, *University of Maryland*
 Jason Schwans, *California State University, Long Beach*
 Jeanie Collins, *University of Southern Indiana*
 Jeff Cohlberg, *California State University, Long Beach*
 Jeffrey Butikofer, *Upper Iowa University*
 Jeffry Nichols, *Worcester State University*
 Jennifer Sniegowski, *Arizona State University Downtown Phoenix Campus*
 Jeremy Thorne, *University of California, Berkeley*
 Jerry Johnson, *University of Houston–Downtown*
 Jim Roesser, *Virginia Commonwealth University*
 Johannes Bauer, *Southern Methodist University*
 John Bellizzi, *University of Toledo*
 John Makemson, *Florida International University*
 John Richardson, *Austin College*
 Judy Moore, *Lenoir-Rhyne University*
 Julie Himmelberger, *DeSales University*
 Justin Donato, *University of St. Thomas*
 Justin Hines, *Lafayette College*
 Kandatege Wimalasena, *Wichita State University*
 Karen McPherson, *Delaware Valley College*
 Kathryn Cole, *Christopher Newport University*
 Kathryn Tiff, *Johns Hopkins University*
 Kelly Johanson, *Xavier University of Louisiana*
 Kenneth Balazovich, *University of Michigan*
 Kevin Cannon, *Pennsylvania State Abington College*
 Kevin Redding, *Arizona State University*
 Kimberly Schultz, *University of Maryland, Baltimore County*
 Kristopher Blee, *California State University, Chico*
 Larry Miller, *Westminster College*
 Laura Zapanta, *University of Pittsburgh*
 Lawrence Gracz, *MCPHS University*
 Lisa Rezende, *University of Arizona*
 Lori Isom, *University of Central Arkansas*
 Lorraine Marsh, *Long Island University*
 Ludeman Eng, *Virginia Tech*
 Madeline Rasche, *California State University, Fullerton*
 Marc Harrold, *Duquesne University*
 Marcello Forconi, *College of Charleston*
 Maria Kuhn, *Madonna University*
 Marilena Hall, *Stonehill College*
 Marina Kazakevich, *University of Massachusetts Dartmouth*
 Mark Brandt, *Rose-Hulman Institute of Technology*
 Mark Kearley, *Florida State University*
 Mary Anderson, *Texas Woman's University*
 Mary Hatcher-Skeers, *Scripps College*
 Megan Erb, *George Mason University*
 Megan Culpepper, *Appalachian State University*
 Michael Griffin, *Chapman University*
 Michael Keck, *Keuka College*
 Michael Koelle, *Yale University*
 Michael Mendenhall, *University of Kentucky*
 Michael Pikaart, *Hope College*
 Michael Sehorn, *Clemson University*
 Michael Trakselis, *Baylor University*
 Min-Hao Kuo, *Michigan State University*
 Narasimha Sreerama, *Colorado State University*
 Nicholas Silvaggi, *University of Wisconsin–Milwaukee*
 Pam Hay, *Davidson College*
 Pamela Osenkowski, *Loyola University Chicago*
 Pan Li, *University at Albany, SUNY*
 Patricia Canaan, *Oklahoma State University*
 Paul Laybourn, *Colorado State University*
 Paul Weber, *Briar Cliff University*

Prudence Hall, *Hiram College*
 Rakesh Mogul, *California State Polytechnic University, Pomona*
 Ramin Radfar, *Wofford College*
 Randy Lewis, *Utah State University*
 Rebecca Alexander, *Wake Forest University*
 Rebecca Bozym, *La Roche College*
 Rhonda Scott, *Southern Adventist University*
 Richard Amasino, *University of Wisconsin–Madison*
 Rob Barber, *University of Wisconsin–Parkside*
 Robert Kiss, *McGill University*
 Robert Shaw, *Texas Tech University*
 Roberts Jackie, *DePauw University*
 Robin Haynes, *Harvard University Extension School*
 Rodney Weilbaecher, *Southern Illinois University School of Medicine*
 Ronald Brosemer, *Washington State University*
 Samuel Butcher, *University of Wisconsin–Madison*
 Sandra Bonetti, *Colorado State University–Pueblo*
 Scott Ensign, *Utah State University*
 Scott Lefler, *Arizona State University*
 Scott Stagg, *Florida State University*
 Shawn Ellerbroek, *Wartburg College*
 Steffen Graether, *University of Guelph*
 Steve Asmus, *Centre College*
 Steven Mansoorabadi, *Auburn University*
 Steven Theg, *University of California, Davis*
 Sung-Kun Kim, *Baylor University*
 Susan White, *Bryn Mawr College*
 Tami Mysliwiec, *Penn State Berks*
 Terrance Kubiseski, *York University*
 Theresa Salerno, *Minnesota State University, Mankato*
 Tiffany Mathews, *Pennsylvania State University*
 Tomas T. Ding, *North Carolina Central University*
 Trevor Moraes, *University of Toronto*
 Warren Johnson, *University of Wisconsin–Green Bay*
 Weiguo Cao, *Clemson University*
 William Boadi, *Tennessee State University*
 Wilson Francisco, *Arizona State University*
 Xuemin Wang, *University of Missouri*
 Yuqi Wang, *Saint Louis University*

Não temos espaço aqui para citar todas as pessoas cujos esforços contribuíram para o desenvolvimento deste livro. Oferecemos nosso sincero agradecimento – e o livro pronto que eles ajudaram a completar. Assumimos, é claro, total responsabilidade por eventuais incorreções.

Queremos agradecer, de modo especial, aos nossos alunos da Universidade de Wisconsin–Madison por inúmeras sugestões e comentários. Se alguma coisa no livro não estiver bem, eles não deixarão de nos informar. Somos muito gratos aos estudantes e ao pessoal de nossos grupos de pesquisa, atuais e do passado, que nos ajudaram a equilibrar as demandas com o nosso tempo; aos nossos colegas do Departamento de Bioquímica da Universidade de Wisconsin–Madison, que nos ajudaram com conselhos e críticas, e a muitos estudantes e professores que nos escreveram para sugerir formas de melhorar o livro. Esperamos que nossos leitores continuem nos proporcionando estímulo para futuras edições.

Finalmente, expressamos nossa profunda gratidão às nossas esposas, Brook e Beth, e às nossas famílias, que tiveram extraordinária paciência e nos apoiaram na redação deste livro.

David L. Nelson
Michael M. Cox

Sumário detalhado

1	Fundamentos da bioquímica	1			
1.1	Fundamentos celulares	2			
	As células são as unidades estruturais e funcionais de todos os organismos vivos	3			
	As dimensões celulares são limitadas pela difusão	3			
	Organismos dos três domínios da vida	3			
	Os organismos diferem amplamente quanto às fontes de energia e aos precursores biossintéticos que utilizam	5			
	Células bacterianas e células arqueias compartilham propriedades comuns, mas diferem em aspectos importantes	5			
	As células eucarióticas têm vários tipos de organelas providas de membranas e podem ser isoladas para estudo	7			
	O citoplasma é organizado pelo citoesqueleto e é altamente dinâmico	7			
	As células constroem estruturas supramoleculares	9			
	Estudos <i>in vitro</i> podem subestimar interações importantes entre moléculas	10			
1.2	Fundamentos químicos	12			
	Biomoléculas são compostos de carbono com uma grande variedade de grupos funcionais	12			
	As células contêm um conjunto universal de moléculas pequenas	13			
	QUADRO 1-1 Peso molecular, massa molecular e suas unidades corretas	13			
	As macromoléculas são os principais constituintes das células	15			
	A estrutura tridimensional é descrita pela configuração e pela conformação	16			
	QUADRO 1-2 Louis Pasteur e atividade óptica: <i>In Vino, Veritas</i>	18			
	As interações entre as biomoléculas são estereoespecíficas	19			
1.3	Fundamentos físicos	21			
	Os organismos vivos existem em um estado estacionário dinâmico e nunca em equilíbrio com o meio em que se encontram	21			
	Os organismos transformam a energia e a matéria do meio	21			
	QUADRO 1-3 Entropia: tudo se desintegra	22			
	A energia dos organismos é fornecida por fluxo de elétrons	22			
	Criar e manter ordem requer trabalho e energia	22			
	Reações de acoplamento de energia nos sistemas biológicos	24			
	K_{eq} e ΔG° são medidas de a tendência das reações ocorrerem espontaneamente	25			
	Enzimas determinam sequências de reações químicas	27			
	O metabolismo é regulado para alcançar um equilíbrio e ser econômico	29			
1.4	Fundamentos genéticos	29			
	A continuidade genética está contida em uma única molécula de DNA	30			
	A estrutura do DNA permite sua replicação e seu reparo com uma fidelidade quase perfeita	31			
	A sequência linear no DNA codifica proteínas com estrutura tridimensional	31			
1.5	Fundamentos evolutivos	32			
	Mudanças nas instruções hereditárias possibilitam a evolução	32			
	As biomoléculas surgiram primeiro na evolução química	33			
	RNA ou precursores semelhantes podem ter sido os primeiros genes e catalisadores	34			
	A evolução biológica começou há mais de três bilhões e meio de anos	35			
	A primeira célula provavelmente usou combustíveis inorgânicos	35			
	As células eucarióticas evoluíram em vários estágios a partir de precursores mais simples	37			
	A anatomia molecular revela relações evolutivas	37			
	A genômica funcional mostra a alocação de genes para processos celulares específicos	39			
	A comparação entre genomas é cada vez mais importante para a biologia e para a medicina humana	39			
I	ESTRUTURA E CATÁLISE	45			
2	Água	47			
2.1	Interações fracas em sistemas aquosos	47			
	Ligações de hidrogênio são responsáveis pelas propriedades incomuns da água	47			
	A água forma ligações de hidrogênio com solutos polares	49			
	A água interage eletrostaticamente com solutos carregados	50			
	A entropia aumenta quando uma substância cristalina se dissolve	51			
	Gases apolares são fracamente solúveis em água	51			
	Compostos apolares forçam mudanças energeticamente desfavoráveis na estrutura da água	51			
	Forças de van der Waals são atrações interatômicas fracas	53			

Interações fracas são cruciais para a estrutura e a função das macromoléculas	54	Peptídeos e polipeptídeos biologicamente ativos ocorrem em uma ampla variação de tamanhos e composições	87
Os solutos afetam as propriedades coligativas de soluções aquosas	55	Algumas proteínas contêm outros grupos químicos além dos aminoácidos	88
2.2 Ionização da água e de ácidos e bases fracos	58	3.3 Trabalhando com proteínas	89
A água pura é levemente ionizada	58	Proteínas podem ser separadas e purificadas	89
A ionização da água é expressa pela constante de equilíbrio	59	Proteínas podem ser separadas e caracterizadas por eletroforese	92
A escala de pH indica as concentrações de H^+ e OH^-	60	Proteínas não separadas podem ser quantificadas	95
Ácidos e bases fracos têm constantes de dissociação ácidas características	61	3.4 Estrutura das proteínas: estrutura primária	96
Curvas de titulação revelam o pK_a de ácidos fracos	62	A função de uma proteína depende da sua sequência de aminoácidos	97
2.3 Tamponamento contra mudanças no pH em sistemas biológicos	63	As sequências de aminoácidos de milhões de proteínas já foram determinadas	97
Tampões são misturas de ácidos fracos e suas bases conjugadas	64	A química de proteínas é mais rica devido a métodos derivados do sequenciamento clássico de polipeptídeos	98
A equação de Henderson-Hasselbalch relaciona o pH, o pK_a e a concentração do tampão	64	A espectrometria de massas é um método alternativo para determinar sequências de aminoácidos	100
Ácidos ou bases fracas tamponam células e tecidos contra as mudanças de pH	65	Pequenos peptídeos e proteínas podem ser sintetizados quimicamente	102
Diabetes não tratado produz uma acidose que traz risco de vida	67	As sequências de aminoácidos fornecem importantes informações bioquímicas	104
QUADRO 2-1 MEDICINA Sendo seu próprio cobaio (Não tente fazer isso em casa!)	68	Sequências de proteínas podem elucidar a história da vida na Terra	104
2.4 A água como reagente	69	QUADRO 3-2 Sequências-consenso e logos de sequências	105
2.5 O ajuste do meio aquoso em organismos vivos	69	4 Estrutura tridimensional das proteínas	115
3 Aminoácidos, peptídeos e proteínas	75	4.1 Visão geral sobre a estrutura das proteínas	115
3.1 Aminoácidos	75	A conformação de uma proteína é estabilizada por interações fracas	116
Os aminoácidos possuem algumas características estruturais em comum	75	A ligação peptídica é rígida e planar	117
Os resíduos de aminoácidos em proteínas são estereoisômeros L	78	4.2 Estrutura secundária das proteínas	119
Os aminoácidos podem ser classificados pelo grupo R	78	A α -hélice é uma estrutura secundária das proteínas muito comum	120
QUADRO 3-1 MÉTODOS Absorção de luz por moléculas: a lei de Lambert-Beer	80	A sequência de aminoácidos afeta a estabilidade da α -hélice	121
Aminoácidos incomuns também têm funções importantes	81	QUADRO 4-1 MÉTODOS Distinção entre giro para a direita e giro para a esquerda	121
Aminoácidos podem agir como ácidos e bases	81	As conformações β organizam as cadeias polipeptídicas em forma de folhas	123
Aminoácidos têm curvas de titulação características	81	Curvas β são comuns em proteínas	123
Curvas de titulação predizem a carga elétrica dos aminoácidos	84	Estruturas secundárias comuns têm ângulos diedros característicos	123
Aminoácidos diferem em suas propriedades acidobásicas	84	As estruturas secundárias comuns podem ser identificadas por difração de raios X	125
3.2 Peptídeos e proteínas	85	4.3 Estruturas terciária e quaternária das proteínas	125
Peptídeos são cadeias de aminoácidos	85	As proteínas fibrosas são adaptadas às funções estruturais	125
Pode-se diferenciar peptídeos pelos seus comportamentos de ionização	86	QUADRO 4-2 Cabelo com ondulado permanente é engenharia bioquímica	127

QUADRO 4-3 MEDICINA Por que marinheiros, exploradores e universitários devem comer frutas e vegetais frescos	128	Dois modelos que propõem mecanismos para a ligação cooperativa	167
A diversidade estrutural reflete a diversidade funcional nas proteínas globulares	130	QUADRO 5-1 MEDICINA Monóxido de carbono: um assassino furtivo	168
A mioglobina forneceu as primeiras noções sobre a complexidade da estrutura globular proteica	131	A hemoglobina também transporta H^+ e CO_2	169
QUADRO 4-4 O Protein Data Bank	132	A ligação do oxigênio com a hemoglobina é regulada por 2,3-bisfosfoglicerato	171
As proteínas globulares têm grande diversidade de estruturas terciárias	133	Anemia falciforme é uma doença molecular da hemoglobina	172
QUADRO 4-5 MÉTODOS Métodos de determinação da estrutura tridimensional das proteínas	134	5.2 Interações complementares entre proteínas e ligantes: o sistema imune e as imunoglobulinas	174
Algumas proteínas ou segmentos proteicos são intrinsecamente desordenados	138	A resposta imune inclui um conjunto de células e proteínas especializadas	174
Motivos de proteínas são as bases para a classificação da estrutura	139	Os anticorpos têm dois sítios idênticos de ligação ao antígeno	175
A estrutura quaternária varia de dímeros simples a grandes complexos	141	Os anticorpos ligam-se ao antígeno de modo firme e específico	177
4.4 Desnaturação e enovelamento das proteínas	142	A interação antígeno-anticorpo é a base para uma grande variedade de procedimentos analíticos importantes	177
A perda de estrutura da proteína determina a perda da função	143	5.3 Interações proteicas moduladas por energia química: actina, miosina e motores moleculares	179
A sequência de aminoácidos determina a estrutura terciária	144	A actina e a miosina são as principais proteínas do músculo	179
Os polipeptídeos enovelam-se rapidamente por um processo gradual	144	Proteínas adicionais organizam os filamentos finos e grossos em estruturas ordenadas	179
Algumas proteínas precisam de ajuda para se enovelarem	146	Os filamentos grossos de miosina deslizam sobre os filamentos finos de actina	182
Defeitos no enovelamento proteico constituem a base molecular de uma ampla gama de doenças genéticas humanas	147	6 Enzimas	187
QUADRO 4-6 MEDICINA Morte por enovelamento errado: doenças de príons	150	6.1 Introdução às enzimas	187
5 Função proteica	157	A maioria das enzimas é proteína	188
5.1 Interação reversível de uma proteína com um ligante: proteínas de ligação ao oxigênio	158	As enzimas são classificadas segundo as reações que catalisam	188
O oxigênio liga-se ao grupo prostético heme	158	6.2 Como as enzimas funcionam	190
As globinas são uma família de proteínas de ligação ao oxigênio	159	As enzimas alteram a velocidade da reação, não o seu equilíbrio	190
A mioglobina tem um único sítio de ligação ao oxigênio	159	A velocidade e o equilíbrio da reação têm definições termodinâmicas precisas	192
As interações proteína-ligante podem ser descritas quantitativamente	159	Poucos princípios são suficientes para explicar o poder catalítico e a especificidade das enzimas	192
A estrutura da proteína afeta a forma pela qual o ligante é ligado	162	As interações fracas entre enzima e substrato são otimizadas no estado de transição	193
A hemoglobina transporta oxigênio no sangue	163	A energia de ligação contribui para a especificidade da reação e a catálise	195
As subunidades da hemoglobina têm estrutura semelhante à da mioglobina	163	Grupos catalíticos específicos contribuem para a catálise	196
A hemoglobina sofre mudança estrutural quando se liga ao oxigênio	164	6.3 A cinética enzimática como abordagem para compreender mecanismos	198
A hemoglobina liga-se ao oxigênio de forma cooperativa	164	A concentração do substrato influi na velocidade das reações catalisadas por enzimas	198
A interação cooperativa do ligante pode ser descrita em termos quantitativos	166		

A relação entre a concentração do substrato e a velocidade da reação pode ser expressa quantitativamente	200	7 Carboidratos e glicobiologia	241
Os parâmetros cinéticos são utilizados para comparar a atividade de enzimas	201	7.1 Monossacarídeos e dissacarídeos	241
QUADRO 6-1 Transformações da equação de Michaelis-Menten: o gráfico duplo-recíproco	202	As duas famílias de monossacarídeos são as aldoses e as cetoses	242
Muitas enzimas catalisam reações com dois ou mais substratos	204	Monossacarídeos têm centros assimétricos	242
A atividade enzimática depende do pH	205	Os monossacarídeos comuns têm estruturas cíclicas	243
A cinética do estado pré-estacionário pode fornecer evidências de etapas específicas das reações	206	Os organismos contêm diversos derivados de hexoses	246
As enzimas estão sujeitas à inibição reversível ou irreversível	206	QUADRO 7-1 MEDICINA Medidas da glicose sanguínea no diagnóstico e no tratamento do diabetes	248
QUADRO 6-2 Testes cinéticos para determinar mecanismos de inibição	209	Os monossacarídeos são agentes redutores	249
QUADRO 6-3 MEDICINA Curando a doença do sono com um cavalo de Tróia bioquímico	211	Os dissacarídeos contêm uma ligação glicosídica	250
6.4 Exemplos de reações enzimáticas	213	QUADRO 7-2 O açúcar é doce, assim como... algumas outras coisas	252
O mecanismo da quimotripsina envolve a acilação e a desacilação de um resíduo de serina	213	7.2 Polissacarídeos	252
O conhecimento do mecanismo das proteases levou a novos tratamentos para infecções por HIV	215	Alguns homopolissacarídeos são formas de armazenamento de combustível	253
A hexocinase sofre um ajuste induzido quando o substrato se liga	218	Alguns homopolissacarídeos têm funções estruturais	255
O mecanismo de reação da enolase requer a presença de íons metálicos	220	Fatores estéricos e ligações de hidrogênio influenciam o enovelamento dos homopolissacarídeos	256
A lisozima utiliza duas reações sucessivas de deslocamento nucleofílico	220	As paredes celulares de bactérias e algas contêm heteropolissacarídeos estruturais	258
O conhecimento de um mecanismo enzimático leva à produção de antibióticos úteis	223	Os glicosaminoglicanos são heteropolissacarídeos da matriz extracelular	258
6.5 Enzimas regulatórias	225	7.3 Glicoconjugados: proteoglicanos, glicoproteínas e glicoesfingolípídeos	261
Enzimas alostéricas sofrem mudanças conformacionais em resposta à ligação de moduladores	226	Os proteoglicanos, macromoléculas presentes na superfície celular e na matriz extracelular, contêm glicosaminoglicanos	261
As propriedades cinéticas das enzimas alostéricas não seguem o comportamento de Michaelis-Menten	227	QUADRO 7-3 MEDICINA Defeitos na síntese ou na degradação de glicosaminoglicanos sulfatados podem levar a doenças graves em seres humanos	264
Algumas enzimas são reguladas por modificações covalentes reversíveis	228	Glicoproteínas têm oligossacarídeos ligados covalentemente	265
Os grupos fosforila afetam a estrutura e a atividade catalítica das enzimas	229	Glicolípídeos e lipopolissacarídeos são componentes de membranas	266
Fosforilações múltiplas possibilitam um controle requintado da regulação	230	7.4 Carboidratos como moléculas informativas: o código dos açúcares	267
Algumas enzimas e outras proteínas são reguladas pela proteólise de precursores de enzimas	230	Lectinas são proteínas que leem o código dos açúcares e controlam muitos processos biológicos	268
A coagulação do sangue é mediada por uma cascata complicada de ativações proteolíticas	232	As interações lectina-carboidrato são altamente específicas e, com frequência, multivalentes	271
Algumas enzimas utilizam vários mecanismos regulatórios	235	7.5 Trabalhando com carboidratos	272
		8 Nucleotídeos e ácidos nucleicos	279
		8.1 Alguns dados básicos	279
		Nucleotídeos e ácidos nucleicos têm pentoses e bases características	279

As ligações fosfodiéster ligam nucleotídeos consecutivos nos ácidos nucleicos	282		
As propriedades das bases nucleotídicas afetam a estrutura tridimensional dos ácidos nucleicos	284		
8.2 Estrutura dos ácidos nucleicos	285	9.2 Utilização de métodos com base no DNA para a compreensão das funções das proteínas	335
O DNA é uma dupla-hélice que armazena informação genética	285	Bibliotecas de DNA são catálogos especializados de informação genética	335
O DNA pode ocorrer em formas tridimensionais diferentes	288	Sequências ou relações estruturais fornecem informações sobre a função das proteínas	335
Certas sequências de DNA adotam estruturas incomuns	289	Proteínas de fusão e imunofluorescência podem revelar a localização de proteínas em células	336
RNA mensageiros codificam para cadeias polipeptídicas	290	Interações proteína-proteína ajudam a elucidar a função proteica	338
Muitos RNA têm estruturas tridimensionais mais complexas	292	Microarranjos de DNA revelam padrões de expressão de RNA e outras informações	341
8.3 Química dos ácidos nucleicos	295	Inativar ou alterar um gene com CRISPR pode revelar a função do gene	342
DNA e RNA duplas-hélices podem ser desnaturados	295	9.3 Genômica e história da humanidade	344
Nucleotídeos e ácidos nucleicos sofrem transformações não enzimáticas	297	QUADRO 9-1 MEDICINA Medicina genômica personalizada	345
Algumas bases do DNA são metiladas	299	Anotação fornece uma descrição do genoma	346
A síntese química de DNA foi automatizada	301	O genoma humano contém vários tipos de sequências	346
As sequências gênicas podem ser amplificadas com a reação em cadeia da polimerase	301	O sequenciamento do genoma dá informações sobre a humanidade	348
As sequências de longas hélices de DNA podem ser determinadas	302	Comparações do genoma ajudam a localizar genes envolvidos em doenças	350
QUADRO 8-1 Uma arma potente em medicina forense	304	Sequências no genoma informam sobre o passado do ser humano e fornecem oportunidades para o futuro	353
Tecnologias de sequenciamento de DNA estão avançando rapidamente	306	QUADRO 9-2 Conhecendo o parente mais próximo da humanidade	353
8.4 Outras funções dos nucleotídeos	310		
Os nucleotídeos carregam energia química nas células	310	10 Lipídeos	361
Nucleotídeos da adenina são componentes de muitos cofatores enzimáticos	311	10.1 Lipídeos de armazenamento	361
Alguns nucleotídeos são moléculas reguladoras	311	Os ácidos graxos são derivados de hidrocarbonetos	361
Os nucleotídeos de adenina também servem como sinais	312	Os triacilgliceróis são ésteres de ácidos graxos e glicerol	363
		Os triacilgliceróis armazenam energia e proporcionam isolamento térmico	364
9 Tecnologias baseadas nas informações do DNA	319	A hidrogenação parcial de óleos de cozinha melhora sua estabilidade, mas cria ácidos graxos com efeitos danosos para a saúde	365
9.1 Estudando os genes e seus produtos	320	As ceras servem como reservas de energia e como impermeabilizantes à água	365
Genes podem ser isolados por clonagem do DNA	320		
Endonucleases de restrição e DNA-ligases produzem DNA recombinante	321	10.2 Lipídeos estruturais em membranas	366
Os vetores de clonagem permitem a amplificação dos segmentos de DNA inseridos	324	Os glicerofosfolipídeos são derivados do ácido fosfatídico	367
Genes clonados podem ser expressos para amplificar a produção de proteínas	327	Alguns glicerofosfolipídeos têm ácidos graxos em ligação éter	368
Muitos sistemas diferentes são utilizados para expressar proteínas recombinantes	328	Os cloroplastos contêm galactolipídeos e sulfolipídeos	369
A alteração de genes clonados produz proteínas alteradas	330	Arqueias contêm lipídeos de membrana únicos	369
Marcadores terminais fornecem instrumentos para a purificação por afinidade	332	Os esfingolipídeos são derivados da esfingosina	369
A reação em cadeia da polimerase pode ser adaptada para clonagem adequada	332	Os esfingolipídeos nas superfícies celulares são sítios de reconhecimento biológico	370

Os fosfolípidos e os esfingolípidos são degradados nos lisossomos	372	prevista a partir da sequência de aminoácidos da proteína	394
Os esteróis têm quatro anéis de carbono fusionados	372	Lípidos ligados covalentemente ancoram algumas proteínas de membrana	395
QUADRO 10-1 MEDICINA Acúmulos anormais de lípidos de membrana: algumas doenças humanas herdadas	373	Proteínas anfitrópicas associam-se reversivelmente com a membrana	397
10.3 Lípidos como sinalizadores, cofatores e pigmentos	374	11.2 Dinâmica da membrana	397
Fosfatidilinositol e derivados da esfingosina atuam como sinalizadores intracelulares	374	Os grupos acila no interior da bicamada estão ordenados em graus variáveis	397
Os eicosanóides carregam mensagens a células próximas	374	O movimento de lípidos através da bicamada necessita de catálise	398
Os hormônios esteróides carregam mensagens entre os tecidos	376	Lípidos e proteínas difundem-se lateralmente na bicamada	399
As plantas vasculares produzem milhares de sinais voláteis	376	Esfingolípidos e colesterol agrupam-se em balsas, ou “raftes”, de membrana	401
As vitaminas A e D são precursoras de hormônios	376	A curvatura e a fusão de membrana são fundamentais para muitos processos biológicos	402
As vitaminas E e K e as quinonas lipídicas são cofatores de oxirredução	378	As proteínas integrais da membrana plasmática estão envolvidas na adesão de superfície, na sinalização e em outros processos celulares	405
Os dolícolis ativam precursores de açúcares para a biossíntese	380	11.3 Transporte de solutos através da membrana	405
Muitos pigmentos naturais são dienos conjugados a lípidos	380	O transporte pode ser passivo ou ativo	406
Os policetídeos são produtos naturais com atividades biológicas	380	Transportadores e canais iônicos possuem algumas propriedades estruturais em comum, mas têm mecanismos de ação diferentes	406
10.4 Trabalhando com lípidos	381	O transportador de glicose de eritrócitos controla o transporte passivo	408
A extração de lípidos requer solventes orgânicos	381	O trocador de cloreto-bicarbonato catalisa o cotransporte eletroneutro de ânions através da membrana plasmática	410
A cromatografia de adsorção separa lípidos de polaridades diferentes	382	QUADRO 11-1 MEDICINA Defeito no transporte de glicose e água em duas formas de diabetes	411
A cromatografia gasosa separa misturas de derivados voláteis de lípidos	382	O transporte ativo resulta em movimento de soluto contra um gradiente de concentração ou eletroquímico	412
A hidrólise específica auxilia na determinação das estruturas dos lípidos	383	ATPases do tipo P sofrem fosforilação durante seus ciclos catalíticos	413
A espectrometria de massa revela a estrutura lipídica completa	383	ATPases tipo V e tipo F são bombas de prótons impulsionadas por ATP	416
O lipidoma busca catalogar todos os lípidos e suas funções	383	Transportadores ABC usam ATP para impulsionar o transporte ativo de uma grande variedade de substratos	416
11 Membranas biológicas e transporte	387	Os gradientes iônicos fornecem a energia necessária para o transporte ativo secundário	418
11.1 Composição e arquitetura das membranas	388	QUADRO 11-2 MEDICINA Canal iônico defeituoso na fibrose cística	419
Cada tipo de membrana tem proteínas e lípidos característicos	388	As aquaporinas formam canais hidrofílicos transmembrana para a passagem de água	423
Todas as membranas biológicas têm em comum algumas propriedades fundamentais	388	Canais iônicos seletivos permitem o movimento rápido de íons através das membranas	425
A bicamada lipídica é o elemento estrutural básico das membranas	389	A função do canal iônico é medida eletricamente	425
Três tipos de proteínas de membrana se diferenciam de acordo com a natureza da associação com a membrana	391	A estrutura do canal de K ⁺ revela a base da sua especificidade	426
Muitas proteínas integrais de membrana atravessam a bicamada lipídica	392	Canais iônicos com portão são fundamentais na função neuronal	427
Regiões hidrofóbicas de proteínas integrais associam-se com os lípidos da membrana	393		
A topologia de uma proteína integral de membrana pode, algumas vezes, ser			

Canais iônicos defeituosos podem ter consequências fisiológicas graves	430	Canais iônicos dependentes de voltagem produzem os potenciais de ação dos neurônios	472
12 Biossinalização	437	Os neurônios têm canais receptores que respondem a diferentes neurotransmissores	473
12.1 Características gerais da transdução de sinal	437	Toxinas que têm canais iônicos como alvos	473
12.2 Receptores associados a proteínas G e segundos mensageiros	440	12.8 Regulação da transcrição por receptores nucleares de hormônios	473
O sistema dos receptores β -adrenérgicos age por meio do segundo mensageiro cAMP	441	12.9 Sinalização em microrganismos e plantas	475
QUADRO 12-1 Proteínas G: comutadores binários na saúde e na doença	444	A sinalização bacteriana requer fosforilação em um sistema binário	475
Vários mecanismos provocam a terminação da resposta β -adrenérgica	447	Os sistemas de sinalização de plantas têm alguns dos mesmos componentes utilizados por micróbios e mamíferos	476
O receptor β -adrenérgico é dessensibilizado pela fosforilação e pela associação com arrestina	448	12.10 Regulação do ciclo celular por proteínas-cinase	476
O AMP cíclico age como segundo mensageiro para muitas moléculas reguladoras	449	O ciclo celular tem quatro estágios	476
Diacilglicerol, inositol-trisfosfato e Ca^{2+} têm funções relacionadas como segundos mensageiros	451	Os níveis de proteínas-cinase dependentes de ciclina oscilam	477
QUADRO 12-2 MÉTODOS FRET: Vendo a bioquímica em uma célula viva	452	As CDKs regulam a divisão celular pela fosforilação de proteínas cruciais	479
O cálcio é um segundo mensageiro localizado no espaço e no tempo	452	12.11 Oncogenes, genes supressores de tumor e morte celular programada	481
12.3 GPCR na visão, olfação e gustação	456	Os oncogenes são formas mutantes dos genes de proteínas que regulam o ciclo celular	481
O olho dos vertebrados utiliza mecanismos de GPCR clássicos	456	QUADRO 12-4 MEDICINA O desenvolvimento de inibidores de proteínas-cinase para o tratamento de câncer	482
QUADRO 12-3 MEDICINA Daltonismo: o experimento de John Dalton após a sua morte	458	Os defeitos em determinados genes eliminam a inibição normal da divisão celular	484
A olfação e a gustação dos vertebrados utilizam mecanismos similares aos do sistema visual	459	Apoptose é o suicídio celular programado	485
Todos os sistemas GPCR possuem algumas características universais em comum	459	II BIOENERGÉTICA E METABOLISMO	491
12.4 Receptores tirosinas-cinase	461	13 Bioenergética e metabolismo	495
A estimulação do receptor de insulina desencadeia uma cascata de reações de fosforilação de proteínas	461	13.1 Bioenergética e termodinâmica	495
O fosfolípídeo de membrana PIP_3 age em uma ramificação da sinalização pela insulina	463	As transformações biológicas de energia obedecem às leis da termodinâmica	496
Interconexões entre sistemas de sinalização são comuns e complexas	465	As células necessitam de fontes de energia livre	497
12.5 Receptores guanilil-ciclase, cGMP e proteína-cinase G	466	A variação da energia livre padrão está diretamente relacionada à constante de equilíbrio	497
12.6 Proteínas adaptadoras multivalentes e balsas lipídicas da membrana	467	A variação de energia livre real depende das concentrações dos reagentes e dos produtos	498
Módulos proteicos se ligam aos resíduos de Tyr, Ser ou Thr das proteínas associadas	468	As variações de energia livre padrão são aditivas	500
Balsas e cavéolas da membrana segregam proteínas sinalizadoras	470	13.2 Lógica química e reações bioquímicas comuns	501
12.7 Canais iônicos controlados por portões	471	As equações bioquímicas e químicas não são idênticas	506
Canais iônicos são a base da sinalização elétrica nas células excitáveis	471	13.3 Transferência de grupos fosforila e ATP	507
		A variação de energia livre para a hidrólise do ATP é grande e negativa	507
		Outros compostos fosforilados e tioésteres também apresentam energia livre de hidrólise elevada	509

O ATP fornece energia por transferência de grupos e não por simples hidrólise	511	Os polissacarídeos e os dissacarídeos da dieta sofrem hidrólise a monossacarídeos	548
O ATP doa grupos fosforila, pirofosforila e adenilila	513	O glicogênio endógeno e o amido são degradados por fosforólise	548
A montagem de macromoléculas informacionais requer energia	514	Outras hexoses podem entrar na via glicolítica em distintos pontos	551
O ATP fornece energia para o transporte ativo e a contração muscular	514	14.3 Destinos do piruvato em condições anaeróbicas: fermentação	552
QUADRO 13-1 O piscar do vaga-lume: notícias brilhantes sobre o ATP	515	O piruvato é o aceptor final de elétrons na fermentação láctica	553
Transfosforilações entre nucleotídeos ocorrem em todos os tipos de células	515	O etanol é o produto reduzido na fermentação alcoólica	553
O polifosfato inorgânico é um doador potencial de grupo fosforila	516	QUADRO 14-2 Atletas, jacarés e celacantos: glicólise em concentrações limitantes de oxigênio	554
13.4 Reações biológicas de oxidação-redução	517	A tiamina-pirofosfato transporta grupos “acetaldeído ativos”	555
O fluxo de elétrons pode realizar trabalho biológico	518	As fermentações são usadas para produzir alguns alimentos comuns e reagentes químicos industriais	555
As reações de oxidação-redução podem ser descritas como semirreações	518	QUADRO 14-3 Fermentação alcoólica: fabricando cerveja e produzindo biocombustíveis	556
As oxidações biológicas geralmente envolvem desidrogenação	518	14.4 Gliconeogênese	558
Os potenciais de redução medem a afinidade por elétrons	520	A conversão de piruvato em fosfoenolpiruvato requer duas reações exergônicas	560
Os potenciais de redução padrão podem ser usados para calcular a variação de energia livre	521	A conversão de frutose-1,6-bisfosfato em frutose-6-fosfato é a segunda reação que deve ser contornada	562
A oxidação celular da glicose em dióxido de carbono requer transportadores de elétrons especializados	522	A conversão de glicose-6-fosfato em glicose é o terceiro ponto a ser contornado	562
Alguns tipos de coenzimas e proteínas servem como transportadores universais de elétrons	522	A gliconeogênese é energeticamente dispendiosa, mas essencial	563
NADH e NADPH atuam com as desidrogenases como transportadores solúveis de elétrons	522	Os intermediários do ciclo do ácido cítrico e alguns aminoácidos são glicogênicos	563
NAD tem funções importantes além de transferir elétrons	524	Os mamíferos não podem converter ácidos graxos em glicose	564
A deficiência de niacina na dieta, a forma vitamínica de NAD e NADP, causa pelagra	524	A glicólise e a gliconeogênese são reguladas mutuamente	564
Os nucleotídeos de flavina são fortemente ligados às flavoproteínas	525	14.5 Oxidação da glicose pela via das pentoses-fosfato	565
14 Glicólise, gliconeogênese e a via das pentoses-fosfato	533	A fase oxidativa produz pentoses-fosfato e NADPH	565
14.1 Glicólise	534	A fase não oxidativa recicla as pentoses-fosfato a glicose-6-fosfato	565
Uma visão geral: a glicólise tem duas fases	534	QUADRO 14-4 MEDICINA Por que Pitágoras não comia falafel: deficiência da glicose-6-fosfato-desidrogenase	566
A fase preparatória da glicólise requer ATP	538	A síndrome de Wernicke-Korsakoff é exacerbada por um defeito na transcetolase	569
A fase de pagamento da glicólise produz ATP e NADH	540	A glicose-6-fosfato é repartida entre a glicólise e a via das pentoses-fosfato	569
O balanço geral mostra um ganho líquido de ATP	544	15 Princípios da regulação metabólica	575
A glicólise é precisamente regulada	545	15.1 Regulação das vias metabólicas	575
A captação da glicose é deficiente no diabetes melito tipo 1	545	As células e os organismos mantêm um estado estacionário dinâmico	576
QUADRO 14-1 MEDICINA A alta taxa da glicólise em tumores sugere alvos para quimioterapia e facilita o diagnóstico	546		
14.2 Vias alimentadoras da glicólise	548		

A quantidade de uma enzima e sua atividade catalítica podem ser reguladas	577	15.4 Metabolismo do glicogênio nos animais	600
As reações longe do equilíbrio são pontos de regulação usuais nas células	580	A degradação do glicogênio é catalisada pela glicogênio-fosforilase	601
Os nucleotídeos de adenina têm papéis especiais na regulação metabólica	582	A glicose-1-fosfato pode entrar na glicólise ou, no fígado, ser usada para repor a glicose sanguínea	601
15.2 Análise do controle metabólico	584	UDP-glicose, um nucleotídeo ligado a um glicídeo, doa glicose para a síntese do glicogênio	603
A contribuição de cada enzima para o fluxo através de uma via é determinada experimentalmente	584	QUADRO 15-4 Carl e Gerty Cori: pioneiros no estudo do metabolismo e das doenças do armazenamento do glicogênio	604
O coeficiente de controle de fluxo quantifica o efeito de uma alteração na atividade enzimática sobre o fluxo metabólico por uma via	585	A glicogenina fornece um fragmento iniciador para a síntese do glicogênio	607
O coeficiente de elasticidade está relacionado com a capacidade de resposta da enzima a alterações na concentração do metabólito ou do regulador	585	15.5 Regulação coordenada da síntese e da degradação do glicogênio	608
QUADRO 15-1 MÉTODOS Análise do controle metabólico: aspectos quantitativos	586	A glicogênio-fosforilase tem regulação alostérica e hormonal	608
O coeficiente de resposta expressa o efeito de um controlador externo sobre o fluxo de uma via	587	A glicogênio-sintase também é regulada por fosforilação e desfosforilação	609
A análise do controle metabólico foi aplicada ao metabolismo de carboidratos, com resultados surpreendentes	588	A glicogênio-sintase-cinase 3 controla algumas ações da insulina	611
A análise do controle metabólico sugere um método geral para o aumento do fluxo por uma via	588	A fosfoproteína-fosfatase 1 é central no metabolismo do glicogênio	612
15.3 Regulação coordenada da glicólise e da gliconeogênese	589	Sinais alostéricos e hormonais coordenam integralmente o metabolismo dos carboidratos	612
As isoenzimas da hexocinase do músculo e do fígado são afetadas diferentemente por seu produto, glicose-6-fosfato	590	Os metabolismos de carboidratos e de lipídeos são integrados por mecanismos hormonais e alostéricos	614
QUADRO 15-2 Isoenzimas: proteínas diferentes que catalisam a mesma reação	590	16 Ciclo do ácido cítrico	619
A hexocinase IV (glicocinase) e a glicose-6-fosfatase são reguladas na transcrição	592	16.1 Produção de acetil-CoA (acetato ativado)	619
A regulação da fosfofrutocinase 1 e da frutose-1,6-bisfosfatase é recíproca	592	O piruvato é oxidado a acetil-CoA e CO ₂	620
A frutose-2,6-bisfosfato é um regulador alostérico potente da PFK-1 e da FBPase-1	593	O complexo da piruvato-desidrogenase requer cinco coenzimas	620
A xilulose-5-fosfato é um regulador-chave do metabolismo dos carboidratos e das gorduras	593	O complexo da piruvato-desidrogenase consiste em três enzimas distintas	621
A enzima glicolítica piruvato-cinase é inibida alostericamente por ATP	595	Na canalização do substrato, o intermediário nunca deixa a superfície da enzima	622
A conversão gliconeogênica do piruvato em fosfoenolpiruvato está sob múltiplos tipos de regulação	595	16.2 Reações do ciclo do ácido cítrico	624
A regulação transcricional da glicólise e da gliconeogênese altera o número de moléculas das enzimas	596	A sequência das reações do ciclo do ácido cítrico é quimicamente lógica	624
QUADRO 15-3 MEDICINA Mutações genéticas que originam formas raras de diabetes	599	O ciclo do ácido cítrico tem oito etapas	626
		QUADRO 16-1 Enzimas plurifuncionais (moonlighting): proteínas com mais de uma função	628
		QUADRO 16-2 Sintases e sintetases; ligases e liases; cinases, fosfatases e fosforilases: sim, os nomes são confusos!	631
		A energia das oxidações do ciclo é conservada de maneira eficiente	633
		QUADRO 16-3 Citrato: uma molécula simétrica que reage assimetricamente	634
		Por que a oxidação do acetato é tão complicada?	635

Os componentes do ciclo do ácido cítrico são importantes intermediários biossintéticos	636	17.3	Corpos cetônicos	668
Reações anapleróticas repõem os intermediários do ciclo do ácido cítrico	636		Os corpos cetônicos formados no fígado são exportados para outros órgãos como combustível	668
A biotina da piruvato-carboxilase transporta grupos CO ₂	638		Os corpos cetônicos são produzidos em excesso no diabetes e durante o jejum	670
16.3	Regulação do ciclo do ácido cítrico	640		
A produção de acetil-CoA pelo complexo da piruvato-desidrogenase é regulada por mecanismos alostéricos e covalentes	640	18	Oxidação de aminoácidos e produção de ureia	675
O ciclo do ácido cítrico é regulado em suas três etapas exergônicas	641	18.1	Destinos metabólicos dos grupos amina	675
A canalização do substrato em complexos multienzimáticos pode ocorrer durante o ciclo do ácido cítrico	641		As proteínas da dieta são enzimaticamente degradadas até aminoácidos	676
Algumas mutações em enzimas do ciclo do ácido cítrico levam ao desenvolvimento de câncer	642		O piridoxal-fosfato participa da transferência de grupos α -amina para o α -cetoglutarato	679
			O glutamato libera seu grupo amina na forma de amônia no fígado	680
			A glutamina transporta a amônia na corrente sanguínea	681
			A alanina transporta a amônia dos músculos esqueléticos para o fígado	682
			A amônia é tóxica para os animais	683
17	Catabolismo dos ácidos graxos	649	18.2	Excreção de nitrogênio e ciclo da ureia
17.1	Digestão, mobilização e transporte de gorduras	650		A ureia é produzida a partir da amônia por meio de cinco etapas enzimáticas
As gorduras da dieta são absorvidas no intestino delgado	650		Os ciclos do ácido cítrico e da ureia podem estar ligados	686
Hormônios ativam a mobilização dos triacilgliceróis armazenados	651		A atividade do ciclo da ureia é regulada em dois níveis	687
Os ácidos graxos são ativados e transportados para dentro das mitocôndrias	652		QUADRO 18-1	MEDICINA Ensaios para avaliar lesão tecidual
17.2	Oxidação de ácidos graxos	654		A interconexão de vias reduz o custo energético da síntese da ureia
A β -oxidação de ácidos graxos saturados tem quatro passos básicos	655			Defeitos genéticos do ciclo da ureia podem ser fatais
Os quatro passos da β -oxidação são repetidos para produzir acetil-CoA e ATP	656	18.3	Vias da degradação dos aminoácidos	690
A acetil-CoA pode ser ainda mais oxidada no ciclo do ácido cítrico	657		Alguns aminoácidos são convertidos em glicose, outros em corpos cetônicos	691
QUADRO 17-1	Uma longa soneca no inverno: oxidando gorduras durante a hibernação	658	Diversos cofatores enzimáticos desempenham papéis importantes no catabolismo dos aminoácidos	691
A oxidação de ácidos graxos insaturados requer duas reações adicionais	659		Seis aminoácidos são degradados até piruvato	694
A oxidação completa de ácidos graxos de número ímpar requer três reações extras	660		Sete aminoácidos são degradados, produzindo acetil-CoA	697
A oxidação dos ácidos graxos é estritamente regulada	661		O catabolismo da fenilalanina é defeituoso geneticamente em algumas pessoas	697
QUADRO 17-2	Coenzima B₁₂: uma solução radical para um problema desconcertante	662	Cinco aminoácidos são convertidos em α -cetoglutarato	700
Fatores de transcrição ativam a síntese de proteínas para o catabolismo de lipídeos	664		Quatro aminoácidos são convertidos em succinil-CoA	701
Defeitos genéticos nas acil-CoA-desidrogenases causam doenças graves	664		Os aminoácidos de cadeia ramificada não são degradados no fígado	702
Os peroxissomos também realizam β -oxidação	664		A asparagina e o aspartato são degradados em oxalacetato	703
As enzimas da β -oxidação de organelas diferentes divergiram durante a evolução	665		QUADRO 18-2	MEDICINA Detetives da ciência solucionam um assassinato misterioso
A oxidação ω dos ácidos graxos ocorre no retículo endoplasmático	666			
O ácido fitânico sofre α -oxidação nos peroxissomos	667			

19	Fosforilação oxidativa	711		
19.1	A cadeia respiratória mitocondrial	712		
	Elétrons são canalizados para aceptores universais de elétrons	712		
	Os elétrons passam por uma série de carreadores ligados à membrana	714		
	Os carreadores de elétrons atuam em complexos multienzimáticos	717		
	Complexos mitocondriais associam-se, formando respirassomos	722		
	Outras vias doam elétrons para a cadeia respiratória via ubiquinona	723		
	QUADRO 19-1 MÉTODOS Determinando estruturas tridimensionais de grandes complexos macromoleculares por criomicroscopia eletrônica de partícula única	724		
	A energia da transferência de elétrons é conservada de maneira eficaz em um gradiente de prótons	724		
	Espécies reativas de oxigênio são geradas durante a fosforilação oxidativa	726		
	As mitocôndrias vegetais têm mecanismos alternativos para oxidar NADH	727		
	QUADRO 19-2 Plantas quentes e malcheirosas e vias respiratórias alternativas	728		
19.2	Síntese de ATP	728		
	No modelo quimiosmótico, oxidação e fosforilação estão obrigatoriamente acopladas	728		
	A ATP-sintase tem dois domínios funcionais, F_0 e F_1	731		
	O ATP é estabilizado em relação ao ADP na superfície de F_1	732		
	O gradiente de prótons impulsiona a liberação de ATP a partir da superfície da enzima	732		
	Cada subunidade β da ATP-sintase pode assumir três diferentes conformações	733		
	A catálise rotacional é a chave para o mecanismo de alteração na ligação durante a síntese de ATP	735		
	De que forma o fluxo de prótons pelo complexo F_0 produz movimento rotacional?	735		
	QUADRO 19-3 MÉTODOS Microscopia de força atômica para visualizar as proteínas de membrana	737		
	O acoplamento quimiosmótico permite estequiometrias não integrais de consumo de O_2 e de síntese de ATP	738		
	A força próton-motriz energiza o transporte ativo	738		
	Sistemas de lançadeiras conduzem indiretamente NADH citosólico para as mitocôndrias para oxidação	739		
19.3	Regulação da fosforilação oxidativa	741		
	A fosforilação oxidativa é regulada pelas necessidades celulares de energia	741		
	Uma proteína inibitória impede a hidrólise de ATP durante a hipoxia	741		
	A hipoxia leva à produção de ERO e a várias respostas adaptativas	742		
	As vias produtoras de ATP são reguladas de modo coordenado	743		
19.4	Mitocôndrias na termogênese, na síntese de esteroides e na apoptose	744		
	O desacoplamento em mitocôndrias do tecido adiposo marrom produz calor	744		
	Monoxigenases P-450 mitocondriais catalisam hidroxilações de esteroides	744		
	As mitocôndrias são de importância central para o início da apoptose	745		
19.5	Genes mitocondriais: suas origens e efeitos das mutações	746		
	As mitocôndrias evoluíram a partir de bactérias endossimbióticas	746		
	Mutações em DNA mitocondrial acumulam-se ao longo de toda a vida do organismo	747		
	Algumas mutações nos genomas mitocondriais causam doenças	748		
	Uma forma rara de diabetes resulta de defeitos nas mitocôndrias das células β pancreáticas	749		
20	Fotossíntese e síntese de carboidratos em plantas	755		
20.1	Absorção de luz	756		
	Os cloroplastos são o sítio onde ocorre o fluxo de elétrons impulsionado pela luz e a fotossíntese nos vegetais	756		
	As clorofilas absorvem energia luminosa para a fotossíntese	759		
	Os pigmentos acessórios ampliam a faixa de absorção de luz	759		
	A clorofila canaliza a energia absorvida para os centros de reação pela transferência de éxcitons	761		
20.2	Centros de reações fotoquímicas	763		
	Bactérias fotossintéticas têm dois tipos de centro de reação	763		
	Fatores cinéticos e termodinâmicos impedem a dissipação da energia por conversão interna	766		
	Nas plantas, dois centros de reação agem em sequência	766		
	O complexo de citocromos b_6f liga os fotossistemas II e I	770		
	O fluxo cíclico de elétrons entre o PSI e o complexo de citocromos b_6f aumenta a produção de ATP em relação a NADPH	771		
	Transições de estado mudam a distribuição do LHCII entre os dois fotossistemas	771		
	A água é quebrada pelo complexo de liberação de oxigênio	773		

20.3 Síntese de ATP pela fotofosforilação	774
Um gradiente de prótons acopla o fluxo de elétrons e a fosforilação	774
A estequiometria aproximada da fotofosforilação foi estabelecida	775
A ATP-sintase dos cloroplastos é semelhante àquela das mitocôndrias	775
20.4 Evolução da fotossíntese oxigênica	776
Os cloroplastos evoluíram a partir de antigas bactérias fotossintéticas	776
Em <i>Halobacterium</i> , uma só proteína absorve luz e bombeia prótons para promover a síntese de ATP	778
20.5 Reações de fixação de carbono	780
A assimilação de dióxido de carbono ocorre em três estágios	780
A síntese de cada triose-fosfato a partir do CO ₂ requer seis NADPH e nove ATP	786
Um sistema de transporte exporta trioses-fosfato do cloroplasto e importa fosfato	788
Quatro enzimas do ciclo de Calvin são indiretamente ativadas pela luz	790
20.6 Fotorrespiração e as vias C₄ e CAM	792
A fotorrespiração resulta da atividade de oxigenase da rubisco	792
A via de salvação do fosfoglicolato é onerosa	793
Em plantas C ₄ , a fixação do CO ₂ e a atividade da rubisco são separadas espacialmente	794
QUADRO 20-1 Poderá a engenharia genética de organismos fotossintéticos aumentar sua eficiência?	796
Em plantas CAM, a captura de CO ₂ e a ação da rubisco estão separadas temporalmente	798
20.7 Biossíntese de amido, sacarose e celulose	798
A ADP-glicose é o substrato para a síntese de amido em plastídeos vegetais e para a síntese de glicogênio em bactérias	798
A UDP-glicose é o substrato para a síntese de sacarose no citosol de células das folhas	799
A conversão de trioses-fosfato em sacarose e amido é firmemente regulada	799
O ciclo do glioxilato e a gliconeogênese produzem glicose em sementes em germinação	800
A celulose é sintetizada por estruturas supramoleculares na membrana plasmática	802
20.8 Integração do metabolismo de carboidratos em plantas	804
Conjuntos (<i>pools</i>) de intermediários em comum conectam vias em diferentes organelas	804

21 Biossíntese de lipídeos	811
21.1 Biossíntese de ácidos graxos e eicosanoides	811
A malonil-CoA é formada a partir de acetil-CoA e bicarbonato	811
A síntese dos ácidos graxos ocorre em uma sequência de reações que se repetem	812
A ácido graxo-sintase de mamíferos tem múltiplos sítios ativos	814
A ácido graxo-sintase recebe grupos acetila e malonila	814
As reações do ácido graxo-sintase são repetidas para formar palmitato	816
A síntese de ácidos graxos é um processo citosólico em muitos organismos, mas nas plantas ela acontece nos cloroplastos	817
O acetato é transportado para fora da mitocôndria como citrato	817
A biossíntese de ácidos graxos é regulada precisamente	818
Os ácidos graxos saturados de cadeia longa são sintetizados a partir do palmitato	820
A dessaturação dos ácidos graxos requer uma oxidase de função mista	821
QUADRO 21-1 MEDICINA Oxidases, oxigenases, enzimas citocromo P-450 e sobredose de fármacos	822
Os eicosanoides são formados a partir de ácidos graxos poli-insaturados de 20 ou 22 carbonos	824
21.2 Biossíntese de triacilgliceróis	826
Os triacilgliceróis e os glicerofosfolipídeos são sintetizados a partir dos mesmos precursores	826
A biossíntese de triacilgliceróis nos animais é regulada por hormônios	827
O tecido adiposo gera glicerol-3-fosfato por meio da gliceroneogênese	829
As tiazolidinedionas no tratamento do diabetes tipo 2 aumentam a gliceroneogênese	829
21.3 Biossíntese de fosfolipídeos de membrana	830
As células dispõem de duas estratégias para o acoplamento dos grupos polares dos fosfolipídeos	830
A síntese dos fosfolipídeos em <i>E. coli</i> utiliza CDP-diacilglicerol	831
Os eucariotos sintetizam fosfolipídeos aniônicos a partir de CDP-diacilglicerol	833
As vias eucarióticas para síntese de fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina são inter-relacionadas	833
A síntese de plasmalogênio requer a formação de um álcool graxo unido por ligação éter	834
As vias de síntese de esfingolipídeos e glicerofosfolipídeos compartilham precursores e alguns mecanismos	835
Os lipídeos polares são direcionados para membranas celulares específicas	835

21.4 Colesterol, esteroides e isoprenoides: biossíntese, regulação e transporte	837	A biossíntese de histidina utiliza precursores da biossíntese de purinas	876
O colesterol é formado a partir da acetil-CoA em quatro etapas	838	A biossíntese de aminoácidos está sob regulação alostérica	877
O colesterol tem destinos diversos	842	22.3 Moléculas derivadas de aminoácidos	880
O colesterol e outros lipídeos são transportados em lipoproteínas plasmáticas	842	A glicina é precursora das porfirinas	880
QUADRO 21-2 MEDICINA Alelos da ApoE predizem incidência da doença de Alzheimer	844	A degradação do heme tem múltiplas funções	882
Os ésteres de colesterila entram nas células por endocitose mediada por receptor	846	QUADRO 22-2 MEDICINA Sobre reis e vampiros	884
A HDL realiza o transporte reverso de colesterol	847	Os aminoácidos são precursores da creatina e da glutatona	884
A síntese e o transporte do colesterol são regulados em vários níveis	847	D-Aminoácidos são encontrados basicamente em bactérias	885
A desregulação do metabolismo do colesterol pode levar à doença cardiovascular	849	Aminoácidos aromáticos são precursores de muitas substâncias de origem vegetal	886
O transporte reverso do colesterol por HDL se opõe à formação da placa e da aterosclerose	850	Aminas biológicas são produtos da descarboxilação dos aminoácidos	886
QUADRO 21-3 MEDICINA A hipótese lipídica e o desenvolvimento das estatinas	851	A arginina é precursora na síntese biológica de óxido nítrico	887
Os hormônios esteroides são formados por clivagem da cadeia lateral e oxidação do colesterol	852	22.4 Biossíntese e degradação de nucleotídeos	888
Os intermediários na biossíntese de colesterol têm muitos destinos alternativos	853	A síntese <i>de novo</i> de nucleotídeos púricos inicia com o PRPP	890
22 Biossíntese de aminoácidos, nucleotídeos e moléculas relacionadas	859	A biossíntese de nucleotídeos púricos é regulada por retroalimentação negativa	892
22.1 Visão geral do metabolismo do nitrogênio	859	Os nucleotídeos pirimídicos são sintetizados a partir de aspartato, PRPP e carbamoyl-fosfato	893
O ciclo do nitrogênio permite a manutenção de um estoque de nitrogênio biologicamente disponível	860	A biossíntese de nucleotídeos pirimídicos é regulada por retroalimentação negativa	893
A fixação do nitrogênio é realizada por enzimas do complexo da nitrogenase	860	Nucleosídeos monofosfatados são convertidos em nucleosídeos trifosfatados	894
QUADRO 22-1 Estilos de vida incomuns de seres obscuros, porém abundantes	862	Os ribonucleotídeos são precursores dos desoxirribonucleotídeos	894
A amônia é incorporada em biomoléculas via glutamato e glutamina	866	O timidilato é derivado do dCDP e do dUMP	898
A reação da glutamina-sintetase é um ponto importante de regulação no metabolismo do nitrogênio	867	A degradação de purinas e pirimidinas produz ácido úrico e ureia, respectivamente	898
Diversas classes de reações desempenham papéis especiais na biossíntese de aminoácidos e nucleotídeos	868	Bases púricas e pirimídicas são recicladas por vias de recuperação	900
22.2 Biossíntese de aminoácidos	869	Excesso de ácido úrico causa gota	900
O α -cetoglutarato origina glutamato, glutamina, prolina e arginina	870	Muitos agentes quimioterápicos têm como alvo enzimas da via biossintética de nucleotídeos	901
Serina, glicina e cisteína são derivadas do 3-fosfoglicerato	872	23 Regulação hormonal e integração do metabolismo em mamíferos	907
Três aminoácidos não essenciais e seis aminoácidos essenciais são sintetizados a partir de oxalacetato e piruvato	873	23.1 Hormônios: estruturas diferentes para funções diferentes	907
O corismato é um intermediário-chave na síntese de triptofano, fenilalanina e tirosina	876	A detecção e a purificação dos hormônios requerem um ensaio biológico	908
		QUADRO 23-1 MEDICINA Como é descoberto um hormônio? O caminho árduo até a insulina purificada	909
		Os hormônios atuam por meio de receptores celulares específicos de alta afinidade	910
		Os hormônios são quimicamente diferentes	911
		A liberação de hormônios é regulada por uma hierarquia de “cima para baixo” de sinais neuronais e hormonais	915

Os sistemas hormonais de “baixo para cima” enviam sinais de volta para o cérebro e para outros tecidos	916	Os simbioses microbianos do intestino influenciam no metabolismo energético e na adipogênese	947
23.2 Metabolismo específico para cada tecido: a divisão de trabalho	918	23.5 Obesidade, síndrome metabólica e diabetes tipo 2	949
O fígado processa e distribui os nutrientes	919	No diabetes tipo 2, os tecidos tornam-se insensíveis à insulina	949
O tecido adiposo armazena e provê ácidos graxos	922	O diabetes tipo 2 é controlado com dieta, exercícios, medicação e cirurgia	950
Os tecidos adiposos marrom e bege são termogênicos	923		
Os músculos usam ATP para trabalho mecânico	925		
QUADRO 23-2 Creatina e creatina-cinase: inestimáveis auxiliares do diagnóstico e amigas dos fisiculturistas	926	III VIAS DA INFORMAÇÃO	955
O cérebro usa a energia para a transmissão de impulsos elétricos	928	24 Genes e cromossomos	957
O sangue transporta oxigênio, metabólitos e hormônios	929	24.1 Elementos cromossômicos	957
23.3 Regulação hormonal do metabolismo energético	930	Os genes são segmentos de DNA que codificam cadeias polipeptídicas e RNA	957
A insulina opõe-se a níveis altos de glicose sanguínea	931	As moléculas de DNA são muito mais longas do que o invólucro celular ou viral que as contém	958
As células β -pancreáticas secretam insulina em resposta a alterações na glicose sanguínea	932	Os genes eucarióticos e os cromossomos são muito complexos	961
O glucagon opõe-se a níveis baixos de glicose sanguínea	934	24.2 DNA supertorcido	963
O metabolismo é alterado durante o jejum e a inanição para prover combustível para o cérebro	935	A maior parte do DNA celular se encontra subenrolada	964
A adrenalina sinaliza atividade iminente	937	O subenrolamento do DNA é definido pelo número de ligação topológico	965
O cortisol sinaliza estresse, incluindo baixa glicose sanguínea	937	As topoisomerases catalisam mudanças no número de ligação do DNA	967
O diabetes melito resulta de defeitos na produção ou na ação da insulina	938	QUADRO 24-1 MEDICINA Curando doenças pela inibição de topoisomerases	970
23.4 Obesidade e regulação da massa corporal	939	A compactação do DNA necessita de uma forma especial de supertorção	970
O tecido adiposo tem funções endócrinas importantes	939	24.3 A estrutura dos cromossomos	972
A leptina estimula a produção de hormônios peptídicos anorexigênicos	941	A cromatina é formada por DNA e por proteínas	972
A leptina dispara uma cascata de sinalização que regula a expressão gênica	941	As histonas são proteínas básicas pequenas	973
O sistema da leptina pode ter evoluído para regular a resposta à fome	942	Os nucleossomos são as unidades fundamentais da organização da cromatina	973
A insulina age no núcleo arqueado, regulando a ingestão de alimento e a conservação de energia	942	Os nucleossomos são empacotados em estruturas cromossômicas altamente condensadas	975
A adiponectina age por meio da AMPK, aumentando a sensibilidade à insulina	942	QUADRO 24-2 MÉTODOS Epigenética, estrutura dos nucleossomos e variantes de histonas	976
AMPK coordena o catabolismo e o anabolismo em resposta ao estresse metabólico	943	As estruturas condensadas dos cromossomos são mantidas pelas proteínas SMC	979
A via mTORC1 coordena o crescimento celular com o suprimento de nutrientes e energia	944	O DNA das bactérias também é altamente organizado	979
A dieta regula a expressão de genes essenciais para a manutenção da massa corporal	945		
O comportamento alimentar a curto prazo é influenciado por grelina, PYY ₃₋₃₆ e canabíoides	946	25 Metabolismo do DNA	987
		25.1 Replicação do DNA	989
		A replicação do DNA segue um conjunto de regras fundamentais	989
		O DNA é degradado por nucleases	991
		O DNA é sintetizado por DNA-polimerases	991
		A replicação tem alto grau de precisão	993
		<i>E. coli</i> tem pelo menos cinco DNA-polimerases	994

A replicação do DNA precisa de muitas enzimas e fatores proteicos	995	Tanto íntrons quanto éxons são transcritos de DNA para RNA	1048
A replicação do cromossomo de <i>E. coli</i> prossegue em estágios	997	O RNA catalisa o <i>splicing</i> de íntrons	1049
A replicação em células eucarióticas é semelhante, porém mais complexa	1003	Os mRNA de eucariotos têm uma estrutura da extremidade 3' característica	1053
DNA-polimerases virais fornecem alvos para a terapia antiviral	1005	Um gene pode dar origem a vários produtos por meio do processamento diferencial do RNA	1054
25.2 Reparo do DNA	1005	RNA ribossômicos e tRNA também sofrem processamento	1055
As mutações estão ligadas ao câncer	1005	Os RNA com função especial sofrem vários tipos de processamento	1059
Todas as células têm sistemas de reparo de DNA múltiplos	1006	As enzimas de RNA são os catalisadores de alguns eventos no metabolismo de RNA	1060
A interação das forquilha de replicação com o dano do DNA pode levar à síntese de DNA translesão propensa a erro	1012	Os mRNA celulares são degradados em taxas diferentes	1062
QUADRO 25-1 MEDICINA Reparo do DNA e câncer	1015	A polinucleotídeo-fosforilase produz polímeros aleatórios semelhantes ao RNA	1063
25.3 Recombinação do DNA	1016	26.3 Síntese de RNA dependente de RNA e síntese de DNA dependente de RNA	1063
A recombinação homóloga bacteriana é uma função de reparo do DNA	1017	A transcriptase reversa produz DNA a partir de RNA viral	1064
A recombinação eucariótica homóloga é necessária para a segregação adequada de cromossomos durante a meiose	1019	Alguns retrovírus causam câncer e Aids	1066
A recombinação durante a meiose se inicia com quebras na dupla-fita	1021	Muitos transposons, retrovírus e íntrons podem ter origem evolutiva comum	1066
QUADRO 25-2 MEDICINA Por que a segregação adequada de cromossomos é importante?	1023	QUADRO 26-2 MEDICINA Combatendo a Aids com inibidores da transcriptase reversa do HIV	1067
Algumas quebras de dupla-fita são reparadas por união de extremidades não homólogas	1024	A telomerase é uma transcriptase reversa especializada	1067
A recombinação sítio-específica resulta em rearranjos de DNA precisos	1025	Alguns RNA são replicados por RNA-polimerases dependentes de RNA	1070
Elementos genéticos de transposição movem-se de um local para outro	1027	A síntese de RNA fornece pistas sobre a origem da vida em um mundo de RNA	1070
Os genes de imunoglobulinas se reúnem por recombinação	1029	QUADRO 26-3 MÉTODOS O método SELEX para gerar polímeros de RNA com novas funções	1072
26 Metabolismo de RNA	1035	27 Metabolismo de proteínas	1077
26.1 Síntese de RNA dependente de DNA	1036	27.1 O código genético	1078
O RNA é sintetizado pelas RNA-polimerases	1036	O código genético foi decifrado utilizando-se moldes artificiais de mRNA	1078
A síntese de RNA começa nos promotores	1038	QUADRO 27-1 Exceções que confirmam a regra: variações naturais no código genético	1082
A transcrição é regulada em vários níveis	1039	A oscilação permite que alguns tRNA reconheçam mais de um códon	1084
QUADRO 26-1 MÉTODOS A RNA-polimerase deixa sua digital em um promotor	1040	O código genético é resistente a mutações	1085
Sequências específicas sinalizam a terminação da síntese de RNA	1041	Mudanças na fase da tradução e edição do RNA afetam a maneira como o código é lido	1085
As células eucarióticas têm três tipos de RNA-polimerases nucleares	1042	27.2 Síntese proteica	1088
A RNA-polimerase II precisa de muitos outros fatores proteicos para a sua atividade	1042	A biossíntese de proteínas ocorre em cinco estágios	1088
A RNA-polimerase DNA-dependente sofre inibição seletiva	1046	O ribossomo é uma máquina supramolecular complexa	1090
26.2 Processamento de RNA	1047	RNA transportadores têm características estruturais próprias	1092
Os mRNA de eucariotos recebem um cap na extremidade 5'	1048		

Etapa 1: as aminoacil-tRNA-sintetases ligam os aminoácidos corretos aos seus respectivos tRNA	1092		
Etapa 2: um aminoácido específico inicia a síntese proteica	1096		
QUADRO 27-2 Expansão natural e artificial do código genético	1098		
Etapa 3: as ligações peptídicas são formadas no estágio de alongamento	1103		
Etapa 4: a terminação da síntese de polipeptídeos necessita de um sinal especial	1107		
QUADRO 27-3 Variação induzida no código genético: supressão sem sentido	1107		
Etapa 5: as cadeias polipeptídicas recém-sintetizadas passam por enovelamento e processamento	1110		
O perfil ribossômico fornece uma visão instantânea da tradução nas células	1111		
A síntese proteica é inibida por muitos antibióticos e toxinas	1112		
27.3 Endereçamento e degradação das proteínas	1114		
As modificações pós-traducionais de muitas proteínas eucarióticas começam no retículo endoplasmático	1114		
A glicosilação tem um papel-chave no endereçamento de proteínas	1115		
As sequências-sinal para o transporte nuclear não são clivadas	1118		
As bactérias também usam sequências-sinal para o endereçamento de proteínas	1118		
As células importam proteínas por meio de endocitose mediada por receptor	1119		
A degradação de proteínas é mediada por sistemas especializados em todas as células	1121		
28 Regulação da expressão gênica	1127		
28.1 Princípios da regulação gênica	1128		
A RNA-polimerase se liga ao DNA nos promotores	1128		
A iniciação da transcrição é regulada por proteínas e RNA	1129		
Muitos genes bacterianos são agrupados e regulados em óperons	1131		
O óperon <i>lac</i> está sujeito à regulação negativa	1131		
As proteínas regulatórias têm domínios de ligação de DNA discretos	1133		
Proteínas regulatórias também têm domínios de interação proteína-proteína	1135		
Interações proteína-proteína em proteínas regulatórias de eucariotos	1136		
28.2 Regulação da expressão gênica em bactérias	1138		
O óperon <i>lac</i> sofre regulação positiva	1138		
Muitos genes que codificam as enzimas da biossíntese de aminoácidos são regulados por atenuação da transcrição	1139		
A indução da resposta SOS requer a destruição das proteínas repressoras	1142		
A síntese de proteínas ribossômicas é coordenada com a síntese de rRNA	1143		
O funcionamento de alguns mRNA é regulado por RNA pequenos em <i>cis</i> ou em <i>trans</i>	1144		
Alguns genes são regulados por recombinação genética	1146		
28.3 Regulação da expressão gênica em eucariotos	1147		
A cromatina ativa na transcrição é estruturalmente distinta da cromatina inativa	1148		
A maioria dos promotores eucarióticos é regulada positivamente	1149		
Ativadores de ligação ao DNA e coativadores facilitam a montagem dos fatores gerais de transcrição	1150		
Os genes do metabolismo da galactose em leveduras estão sujeitos às regulações positiva e negativa	1153		
Ativadores da transcrição têm estrutura modular	1154		
A expressão gênica nos organismos eucarióticos pode ser regulada por sinais intercelulares e intracelulares	1155		
A regulação pode resultar da fosforilação de fatores de transcrição nuclear	1157		
Muitos mRNA de eucariotos estão sujeitos à repressão da tradução	1157		
O silenciamento gênico pós-transcrição é mediado por RNA de interferência	1158		
A regulação da expressão gênica mediada por RNA se dá por várias formas nos eucariotos	1159		
O desenvolvimento é controlado por cascatas de proteínas regulatórias	1160		
Células-tronco têm um potencial de desenvolvimento que pode ser controlado	1165		
QUADRO 28-1 Sobre barbatanas, asas, picos e outras coisas	1168		
Teste seu conhecimento: solução dos problemas	1173		
Glossário	1207		

Fundamentos da bioquímica

1.1	Fundamentos celulares	2
1.2	Fundamentos químicos	12
1.3	Fundamentos físicos	21
1.4	Fundamentos genéticos	29
1.5	Fundamentos evolutivos	32

Há cerca de catorze bilhões de anos, o universo surgiu como uma explosão cataclísmica de partículas subatômicas quentes e ricas em energia. Logo nos primeiros segundos, formaram-se os elementos mais simples (hidrogênio e hélio). À medida que o universo se expandia e esfriava, o material condensava sob a influência da gravidade, formando estrelas. Algumas estrelas atingiram tamanhos enormes e, então, explodiram como supernovas, liberando a energia necessária para a fusão dos núcleos atômicos mais simples, formando, assim, os elementos mais complexos. Átomos e moléculas formaram nuvens de partículas de pó e a sua agregação levou, por fim, à formação de rochas, planetóides e planetas. Dessa maneira, foram produzidos, no decurso de bilhões de anos, a própria Terra e os elementos químicos que hoje existem nela. A vida surgiu na Terra há cerca de quatro bilhões de anos como microrganismos simples com a capacidade de extrair energia de compostos químicos e, mais tarde, da luz solar. Eles usavam essa energia para produzir um vasto conjunto de **biomoléculas** mais complexas a partir dos elementos simples e compostos presentes na superfície terrestre. Os seres humanos e todos os outros organismos vivos são feitos a partir da poeira estelar.

A bioquímica questiona como as extraordinárias propriedades dos organismos vivos se originaram a partir de milhares de biomoléculas diferentes. Quando essas moléculas são isoladas e examinadas individualmente, elas seguem todas as leis físicas e químicas que descrevem o comportamento da matéria inanimada. Todos os processos que ocorrem nos organismos vivos também seguem todas as leis físicas e químicas. O estudo da bioquímica mostra como o conjunto de moléculas inanimadas que constituem os organismos vivos interage para manter e perpetuar a vida obedecendo unicamente às leis físicas e químicas que regem o universo inanimado.

Ainda assim, os organismos vivos têm propriedades extraordinárias que os diferenciam muito de qualquer conjunto de matéria. Contudo, quais são essas propriedades peculiares dos organismos vivos?

Alto grau de complexidade química e de organização microscópica. Milhares de moléculas diferentes formam as estruturas intrincadas do interior das células (**Figura 1-1a**). Elas incluem polímeros muito longos, cada qual com uma sequência característica de subunidades, uma estrutura tridimensional única e seletividade muito específica de parceiros para interação na célula.

Sistemas para extrair, transformar e utilizar a energia do ambiente (Figura 1-1b) permitem aos organismos construir e manter suas estruturas intrincadas, assim como realizar trabalho mecânico, químico, osmótico e elétrico. Isso se contrapõe à tendência de toda a matéria de decair para um estado mais desorganizado e, assim, entrar em equilíbrio com o ambiente.

Cada um dos componentes de um organismo tem funções bem determinadas e as interações entre eles são reguladas. Isso é válido não somente para as estruturas macroscópicas, como folhas e ramos ou corações e pulmões, mas também para as estruturas intracelulares microscópicas e os compostos químicos individuais. As interações entre os componentes químicos de um organismo vivo são dinâmicas; mudanças em um componente causam mudanças coordenadas ou compensatórias em outro, com o todo apresentando características para além daquelas das partes individualmente. O conjunto de moléculas realiza um programa, cujo resultado é a reprodução e a autoperpetuação do conjunto de moléculas – em resumo, a vida.

Mecanismos para sentir e responder a alterações no ambiente. Os organismos, constantemente, ajustam-se a essas mudanças por adaptações na química interna ou na localização no ambiente.

Capacidade para se autorreplicar e se automontar com precisão (Figura 1-1c). Uma célula bacteriana isolada colocada em um meio nutritivo estéril pode dar origem, em 24 horas, a um bilhão de “filhas” idênticas. Cada célula contém milhares de moléculas diferentes, muitas extremamente complexas; mas cada bactéria é uma cópia fiel da original e sua construção foi totalmente dirigida pela informação contida no material genético da célula original. Em uma escala maior, a prole de um animal vertebrado mostra uma semelhança marcante com a dos pais, também como consequência da herança dos genes parentais.

As células são as unidades estruturais e funcionais de todos os organismos vivos

Células de todos os tipos compartilham algumas características estruturais comuns (**Figura 1-3**). A **membrana plasmática** define o contorno da célula, separando o seu conteúdo do ambiente externo. Ela é composta por moléculas de lipídeos e proteínas que formam uma barreira fina, resistente, flexível e hidrofóbica ao redor da célula. A membrana é uma barreira para a passagem livre de íons inorgânicos e para a maioria dos compostos carregados ou polares. Proteínas de transporte na membrana plasmática possibilitam a passagem de determinados íons e moléculas; proteínas receptoras transmitem sinais para o interior da célula; e enzimas de membrana participam em algumas vias de reações. Como os lipídeos e as proteínas da membrana individuais não estão ligados covalentemente, toda a estrutura é extraordinariamente flexível, permitindo mudanças tanto na forma como no tamanho da célula. À medida que a célula cresce, novas moléculas de proteínas e de lipídeos são inseridas na membrana plasmática; a divisão celular produz duas novas células, cada qual com a sua própria membrana. O crescimento e a divisão celular (fissão) ocorrem sem perda da integridade da membrana.

O volume interno envolto pela membrana plasmática, o **citoplasma** (Figura 1-3), é composto por uma solução aquosa, o **citossol**, e uma grande variedade de partículas em suspensão com funções específicas. Esses componentes particulados (organelas envoltas por membrana, como mitocôndria e cloroplastos; estruturas supramoleculares, como **ribossomos** e **proteassomos**, os locais de síntese e degradação das proteínas) sedimentam quando o citoplasma é centrifugado a 150.000 *g* (*g* é aceleração da gravidade na superfície da Terra). O que sobra como sobrenadante líquido é o citossol, uma solução altamente concentrada contendo enzimas e as moléculas de RNA que as codificam, os componentes (aminoácidos e nucleotídeos) usados para formar essas moléculas, centenas de moléculas orgânicas pequenas, denominadas **metabólitos**, intermediários das

vias de síntese e de degradação; **coenzimas**, compostos essenciais para muitas das reações catalizadas por enzimas e íons inorgânicos (p. ex., K^+ , Na^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+}).

Todas as células têm, pelo menos em algum momento de sua vida, um **nucleoide** ou um **núcleo**, onde o **genoma** – o conjunto completo de genes composto por DNA – é replicado e armazenado, associado com determinadas proteínas. Nas bactérias e nas arqueias, o nucleoide não é separado do citoplasma por uma membrana, e, nos **eucariotos**, o núcleo é confinado dentro de uma dupla membrana, o envelope nuclear. As células com envelope nuclear compõem o grande grupo dos Eukarya (do grego, *eu*, “verdade”, e *karyon*, “núcleo”). Os microrganismos sem membrana nuclear, antes classificados como **procariotos** (do grego, *pro*, “antes”), são agora reconhecidos como pertencentes a dois grupos muito distintos: Bacteria e Archaea, descritos a seguir.

As dimensões celulares são limitadas pela difusão

A maioria das células é microscópica, invisível a olho nu. As células dos animais e das plantas têm um diâmetro geralmente de 5 a 100 μm , e muitos microrganismos unicelulares têm comprimento de 1 a 2 μm (ver na face interna da contracapa as informações sobre as unidades e suas abreviaturas). O que limita o tamanho de uma célula? O limite inferior provavelmente é determinado pelo número mínimo de cada tipo de biomolécula necessária para a célula. As menores células, certas bactérias conhecidas como micoplasmas, têm diâmetro de 300 nm e volume de cerca de 10^{-14} mL. Um único ribossomo bacteriano tem 20 nm na sua dimensão mais longa, de forma que poucos ribossomos ocupam uma fração substancial do volume total de uma célula de micoplasma.

O limite superior para o tamanho das células provavelmente é determinado pela taxa de difusão de moléculas de soluto nos sistemas aquosos. Por exemplo, uma célula bacteriana que depende de reações que consomem oxigênio para extração de energia deve obter oxigênio molecular presente no meio ambiente por meio da membrana plasmática. A célula é tão pequena, e a relação entre a área da superfície e o volume é tão grande, que cada parte do citoplasma é facilmente alcançada pelo O_2 que se difunde para dentro da célula. Com o aumento do tamanho, no entanto, a relação área-volume diminui, até que o metabolismo passe a consumir O_2 mais rapidamente do que o que pode ser suprido por difusão. Assim, o metabolismo, que necessita de O_2 , torna-se impossível quando o tamanho da célula aumenta para além de certo ponto, determinando um limite superior teórico para o tamanho das células. O oxigênio é somente uma entre as muitas espécies moleculares de baixo peso que precisam se difundir de fora da célula para várias regiões do seu interior, de modo que esse argumento sobre a relação área-volume se aplica a cada espécie molecular. Muitos tipos de células animais possuem superfície altamente dobrada e com convoluções que fazem a relação entre a superfície e o volume ser aumentada, de modo a permitir altos índices de tomada de materiais dos arredores (**Figura 1-4**).

Organismos dos três domínios da vida

A disponibilidade de técnicas de determinação de sequências de DNA rápidas e baratas aumentou muito a capacidade

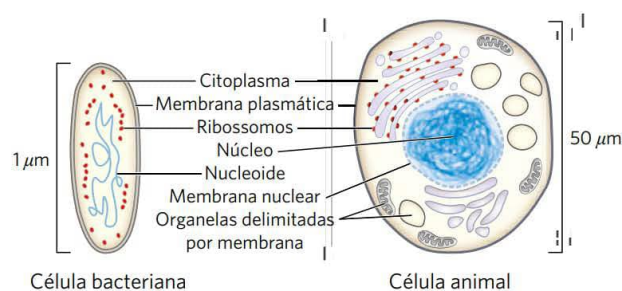


FIGURA 1-3 As características universais das células vivas. Todas as células têm núcleo ou nucleóide contendo DNA, membrana plasmática e citoplasma. O citossol é definido como a porção do citoplasma que permanece no sobrenadante após rompimento suave da membrana plasmática e centrifugação do extrato resultante a 150.000 *g* por 1 hora. As células eucarióticas têm uma grande variedade de organelas delimitadas por membranas (mitocôndrias e cloroplastos) e partículas maiores (p. ex., ribossomos), que são sedimentadas nestas condições de centrifugação e podem ser recuperadas no precipitado.

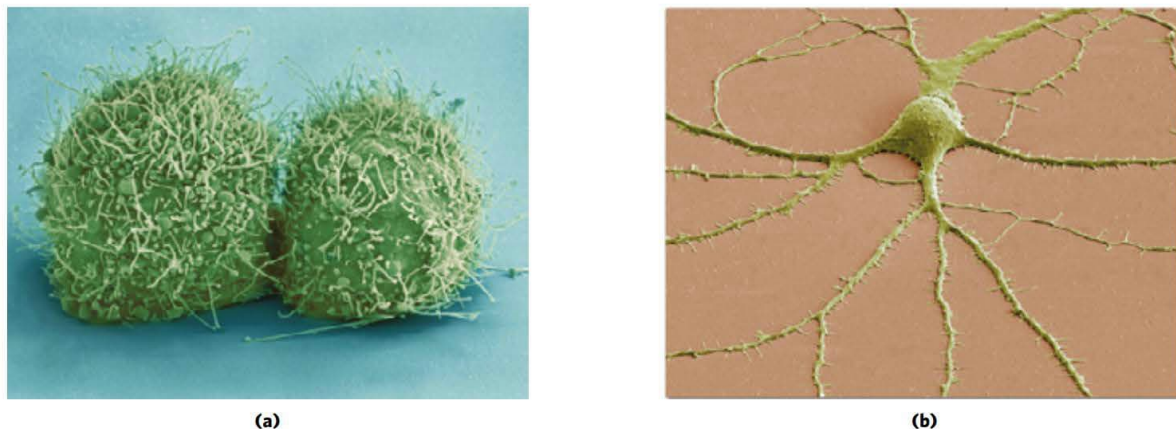


FIGURA 1-4 A maioria das células possui estruturas intrincadamente enoveladas na superfície. Microscopia eletrônica de varredura colorizada, mostrando (a) a superfície altamente cheia de reentrâncias das células HeLa, uma linhagem de células de câncer humano cultivada em laboratório e (b) de um neurônio com seus múltiplos prolongamentos, cada um deles capaz de fazer conexões com outros neurônios. [Fontes: (a) NIH National Institute of General Medical Sciences. (b) 2012 National Center for Microscopy & Imaging Research.]

de deduzir as relações entre a evolução dos diferentes seres vivos. As semelhanças entre sequências de genes de diversos organismos propiciam uma visão aprofundada do processo evolutivo. Uma das maneiras de interpretar as semelhanças de sequências permite enquadrar todos os organismos vivos dentro de um dos três grandes grupos que definem os três ramos da árvore da evolução da vida, originada a partir de um organismo primordial (**Figura 1-5**). Pode-se diferenciar dois grandes grupos de microrganismos unicelulares de acordo com bases genéticas e bioquímicas:

Bactéria e Archaea. As bactérias habitam o solo, as águas superficiais e os tecidos de organismos vivos ou em decomposição. Muitas das arqueias, reconhecidas na década de 1980 por Carl Woese como um grupo distinto, habitam ambientes extremos – lagos de sais, fontes hidrotérmicas, pântanos altamente ácidos e profundezas dos oceanos. As evidências disponíveis sugerem que Bactéria e Archaea divergiram cedo na evolução. Todos os organismos eucariotos, que formam o terceiro domínio, **Eukarya**, evoluíram a partir do mesmo ramo que deu origem a Archaea; por isso,

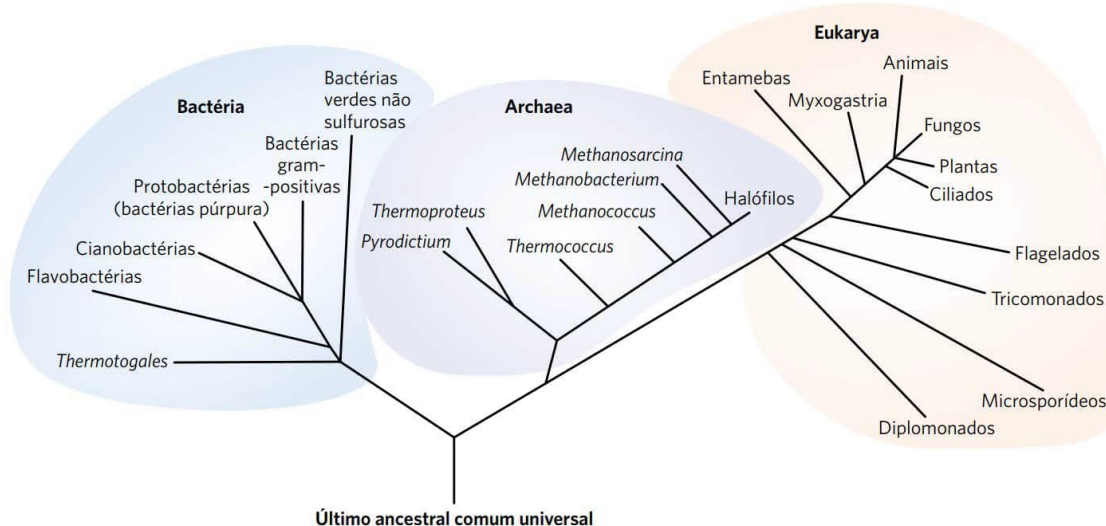


FIGURA 1-5 Filogenia dos três domínios da vida. As relações filogenéticas são frequentemente representadas por uma “árvore genealógica” desse tipo. A base para construir esta árvore é a semelhança na sequência nucleotídica dos RNA dos ribossomos de cada grupo; a distância entre os ramos representa o grau de diferença entre duas sequências; quanto mais similar for a sequência, mais próxima é a localização dos ramos. Árvores filogenéticas também podem ser construídas a partir de semelhanças entre a sequência de aminoácidos de uma determinada proteína nas diferentes espécies. Por exemplo, para gerar a árvore da Figura 3-35 foram comparadas as sequências da proteína GroEL (proteína bacteriana que atua no enovelamento proteico). A árvore da Figura 3-36 é a árvore “consenso”, que usa várias comparações como estas para fazer a melhor estimativa do relacionamento evolutivo de um grupo de organismos. Sequências genômicas de um amplo grupo de bactérias, arqueias e eucariotos também são consistentes com o modelo de dois domínios no qual os eucariotos estão dentro do domínio Archaea. À medida que mais genomas são sequenciados, determinados modelos parecem se enquadrar melhor aos dados. [Fonte: informações de C. R. Woese, *Microbiol. Rev.* 51:221, 1987, Fig. 4.]

os eucariotos estão mais proximamente relacionados às arqueias do que às bactérias.

Dentro dos domínios Archaea e Bacteria existem subgrupos que se diferenciam de acordo com o habitat. Alguns dos organismos que vivem em habitat **aeróbico** com suprimento abundante de oxigênio obtêm energia transferindo elétrons, dentro das células, das moléculas de combustível para o oxigênio. Outros ambientes são **anaeróbicos**, praticamente desprovidos de oxigênio, e os microrganismos adaptados a esses ambientes obtêm energia pela transferência de elétrons para nitrato (formando N_2), sulfato (formando H_2S) ou CO_2 (formando CH_4). Muitos dos organismos que evoluíram em ambientes anaeróbicos são anaeróbios *obrigatórios*: morrem quando expostos ao oxigênio. Outros são anaeróbicos *facultativos*, capazes de viver com ou sem oxigênio.

Os organismos diferem amplamente quanto às fontes de energia e aos precursores biossintéticos que utilizam

É possível classificar os organismos pela maneira como obtêm a energia e o carbono de que necessitam para sintetizar o material celular (resumido na **Figura 1-6**). Eles são classificados em duas grandes categorias de acordo com as

fontes de energia: **fototróficos** (do grego, *trophē*, “nutrição”), que captam e usam a luz solar, e **quimiotróficos**, que obtêm sua energia pela oxidação de um combustível químico. Alguns organismos quimiotróficos oxidam combustíveis inorgânicos — HS^- a S^0 (enxofre elementar), S^0 a SO_4^{2-} , NO_2^- a NO_3^- , ou Fe^{2+} a Fe^{3+} , por exemplo. Os fototróficos e os quimiotróficos podem ser ainda divididos de acordo com o fato de poderem sintetizar todas as suas biomoléculas diretamente do CO_2 (**autotróficos**) ou requererem nutrientes orgânicos previamente formados por outros organismos (**heterotróficos**). É possível descrever o modo de nutrição de um organismo pela combinação desses termos. Por exemplo, cianobactérias são fotoautotróficas; seres humanos são quimio-heterotróficos. Distinções ainda mais sutis podem ser feitas, pois muitos organismos podem obter energia e carbono de mais de uma fonte sob diferentes condições ambientais ou de desenvolvimento.

Células bacterianas e células arqueias compartilham propriedades comuns, mas diferem em aspectos importantes

Escherichia coli, a bactéria mais estudada, é geralmente um habitante inofensivo do sistema digestório. A célula de

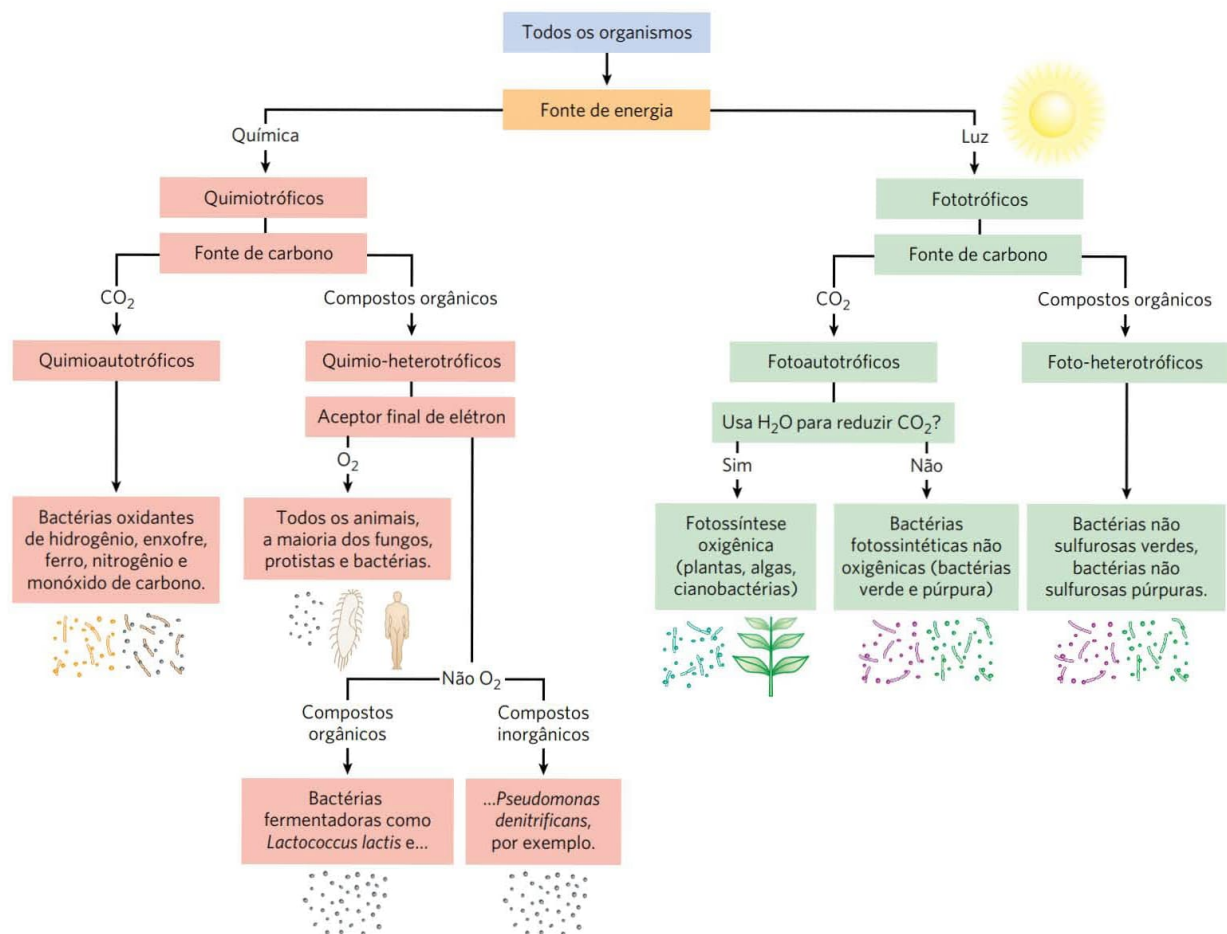


FIGURA 1-6 Todos os organismos podem ser classificados de acordo com a fonte de energia (luz solar ou compostos químicos oxidáveis) e pela fonte de carbono usada para a síntese do material celular.

E. coli (Figura 1-7a) é um ovoide de cerca de 2 μm de comprimento e menos de 1 μm de diâmetro, outras bactérias podem ser esféricas ou na forma de bastão e algumas são bem maiores. *E. coli* tem uma membrana externa protetora e uma membrana plasmática interna que envolve o citoplasma e o nucleóide. Entre a membrana interna e a externa existe uma fina, mas resistente, camada de um polímero de alto peso molecular (peptidoglicano) que confere à célula sua forma e rigidez. A membrana plasmática e as camadas externas a ela constituem o **envelope celular**. A membrana plasmática das bactérias consiste em uma bicamada fina de moléculas lipídicas impregnada com proteínas. As membranas plasmáticas arqueanas têm arquitetura similar, porém os lipídeos podem ser acentuadamente diferentes dos lipídeos de bactérias (ver Figura 10-11). Bactérias e arqueias têm especializações grupo-específicas em seus envelopes celulares (Figura 1-7b-d). Algumas bactérias, cha-

mas gram-positivas porque se coloram com o corante de Gram (desenvolvido por Hans Peter Gram, em 1882), têm uma camada espessa de peptidoglicanos na parte externa da membrana plasmática, mas não apresentam membrana externa. As bactérias gram-negativas têm uma membrana externa formada por uma bicamada lipídica, na qual estão inseridos lipopolissacarídeos complexos e proteínas denominadas porinas que fornecem canais transmembrana para a difusão de compostos de baixa massa molecular e íons através da própria membrana externa. As estruturas na parte externa da membrana plasmática das arqueias diferem de organismo para organismo, mas elas também têm uma camada de peptidoglicanos ou proteínas que conferem rigidez aos seus envelopes celulares.

O citoplasma da *E. coli* contém cerca de 15 mil ribossomos, várias cópias (de 10 a milhares) de cada uma das aproximadamente 1.000 diferentes enzimas, talvez 1.000 com-

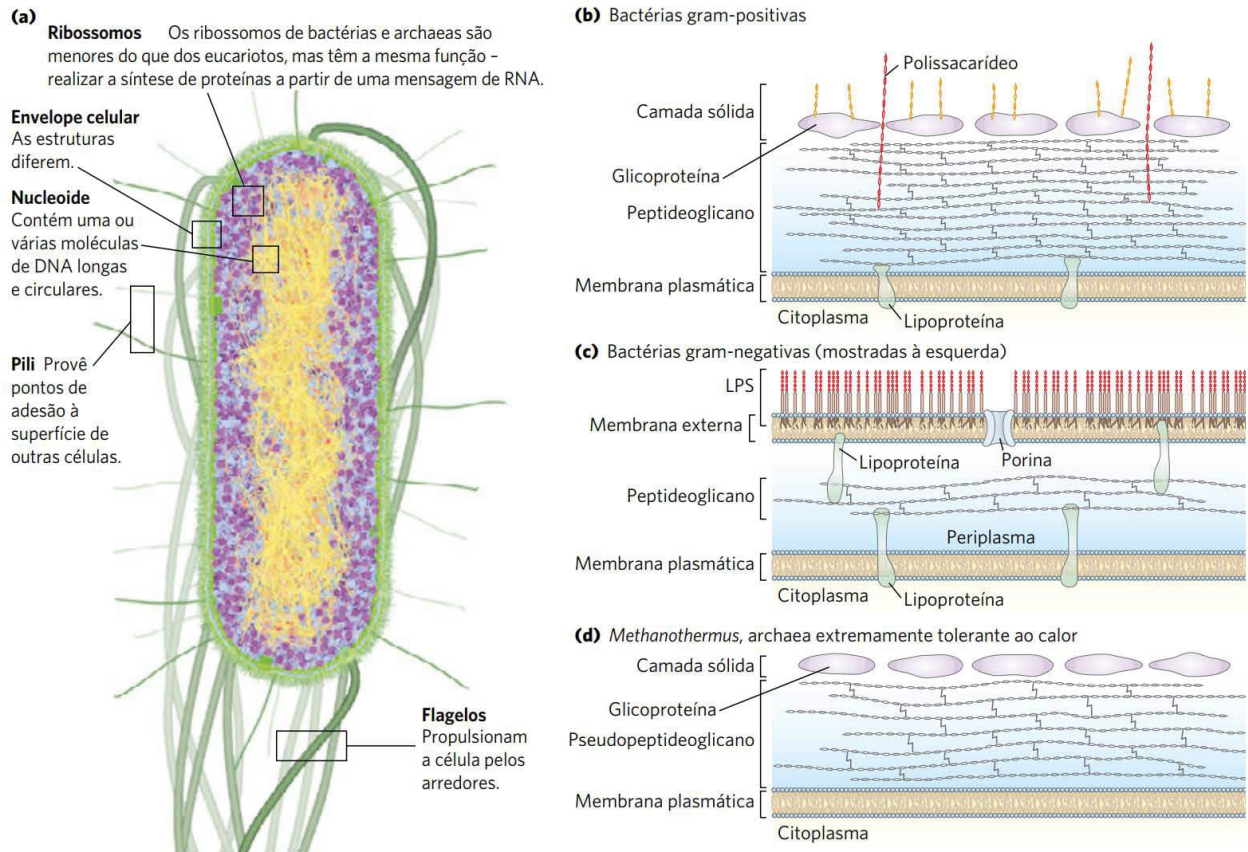


FIGURA 1-7 Características estruturais comuns das células de bactérias e arqueias. (a) Este desenho em escala da *E. coli* serve para ilustrar algumas características comuns. (b) O envelope celular das bactérias gram-positivas é formado por uma única membrana com uma camada grossa e rígida de peptidoglicanos em sua superfície externa. Vários tipos de polissacarídeos e outros polímeros complexos estão entrelaçados com os peptidoglicanos e, recobrendo o todo, existe uma "camada sólida" e porosa de glicoproteínas. (c) *E. coli* é gram-negativa e tem uma membrana dupla. Sua membrana externa tem um lipopolissacarídeo (LPS) na superfície externa e fosfolipídeos na superfície interna. Essa membrana externa está impregnada de canais proteicos (porinas) que permitem a difusão de pequenas moléculas através deles, mas não de outras proteínas. A membrana interna (plasmática), feita de fosfolipídeos e proteínas, é impermeável a ambas, tanto moléculas pequenas como grandes. Entre as membranas interna e externa, no periplasma, existe uma camada delgada de peptidoglicanos, que confere à célula forma e rigidez, mas que não retém o corante de Gram. (d) As membranas de arqueias variam em estrutura e composição, mas todas têm membrana única cercada por uma camada externa que inclui uma estrutura tipo peptidoglicano, uma camada de proteínas porosas (camada sólida), ou ambas. [Fontes: (a) David S. Goodsell. (b, c, d) Informações de S.-V. Albers e B. H. Meyer, *Nature Rev. Microbiol.* 9:414, 2011, Fig. 2.]

postos orgânicos de massa molecular menor do que 1.000 (metabólitos e cofatores) e uma variedade de íons inorgânicos. O nucleóide contém uma única molécula de DNA circular, e o citoplasma (como na maioria das bactérias) contém um ou mais segmentos de DNA circular, chamados de **plasmídeos**. Na natureza, alguns plasmídeos conferem resistência a toxinas e antibióticos presentes no ambiente. Esses segmentos de DNA circular são práticos para a manipulação experimental em laboratório e são ferramentas poderosas para a engenharia genética (ver Capítulo 9).

Outras espécies de Bacteria e de Archaea contêm um conjunto similar de moléculas, mas cada espécie tem especializações físicas e metabólicas relacionadas ao nicho ambiental e a fontes nutricionais. Cianobactérias, por exemplo, têm membranas internas especializadas em capturar energia da luz (Figura 20-27). Muitas arqueias vivem em ambientes extremos e têm adaptações bioquímicas para sobreviver em extremos de temperatura, pressão ou concentração de sal. Diferenças observadas na estrutura dos ribossomos deram a primeira indicação de que Bacteria e Archaea constituem grupos diferentes. A maioria das bactérias (inclusive *E. coli*) existe na forma de células individuais, mas muitas vezes se associam a biofilmes ou películas, nos quais inúmeras células se aderem umas às outras e ao mesmo tempo ao substrato sólido que fica junto ou próximo de alguma superfície aquosa. Células de algumas espécies de bactérias (p. ex., mixobactéria) apresentam um comportamento social simples, formando agregados multicelulares em resposta a sinais vindos de células vizinhas.

As células eucarióticas têm vários tipos de organelas providas de membranas e podem ser isoladas para estudo

As células eucarióticas típicas (Figura 1-8) são muito maiores do que as bactérias – em geral, com diâmetro entre 5 e 100 μm e um volume de mil a um milhão de vezes maior do que o das bactérias. As características que distinguem os eucariotos são o núcleo e uma grande variedade de organelas envolvidas por membranas com funções específicas. Entre essas organelas estão a **mitocôndria**, o local da maior parte das reações extratoras de energia da célula; o **retículo endoplasmático** e o **complexo de Golgi**, que desempenham papéis centrais na síntese e no processamento de lipídeos e proteínas de membrana; os **peroxissomos**, onde ácidos graxos de cadeia muito longa são oxidados; e os **lisossomos**, contendo enzimas digestivas que degradam restos celulares não necessários. Além dessas organelas, as células vegetais também têm **vacúolos** (que acumulam grandes quantidades de ácidos orgânicos) e **cloroplastos** (nos quais a luz solar realiza a síntese de ATP no processo da fotossíntese) (Figura 1-8). No citoplasma de muitas células também estão presentes grânulos ou gotículas que armazenam nutrientes, como amido e gordura.

Um avanço importante na bioquímica foi o desenvolvimento, por Albert Claude, Christian de Duve e George Palade, de métodos para separar as organelas do citosol e entre si – etapa essencial na investigação das respectivas estruturas e funções. Em um processo comum de fracionamento (Figura 1-9), as células ou tecidos em solução são suavemente rompidos por cisalhamento físico. Esse

tratamento rompe a membrana plasmática, porém deixa intacta a maioria das organelas. O homogeneizado é, então, centrifugado; organelas, como núcleo, mitocôndria e lisossomos, diferem em tamanho e por isso sedimentam com velocidades diferentes.

Esses métodos foram utilizados para descobrir, por exemplo, que os lisossomos contêm enzimas degradativas, as mitocôndrias contêm enzimas oxidativas e os cloroplastos contêm pigmentos fotossintéticos. O isolamento de uma organela rica em determinada enzima é, com frequência, a primeira etapa de purificação dessa enzima.

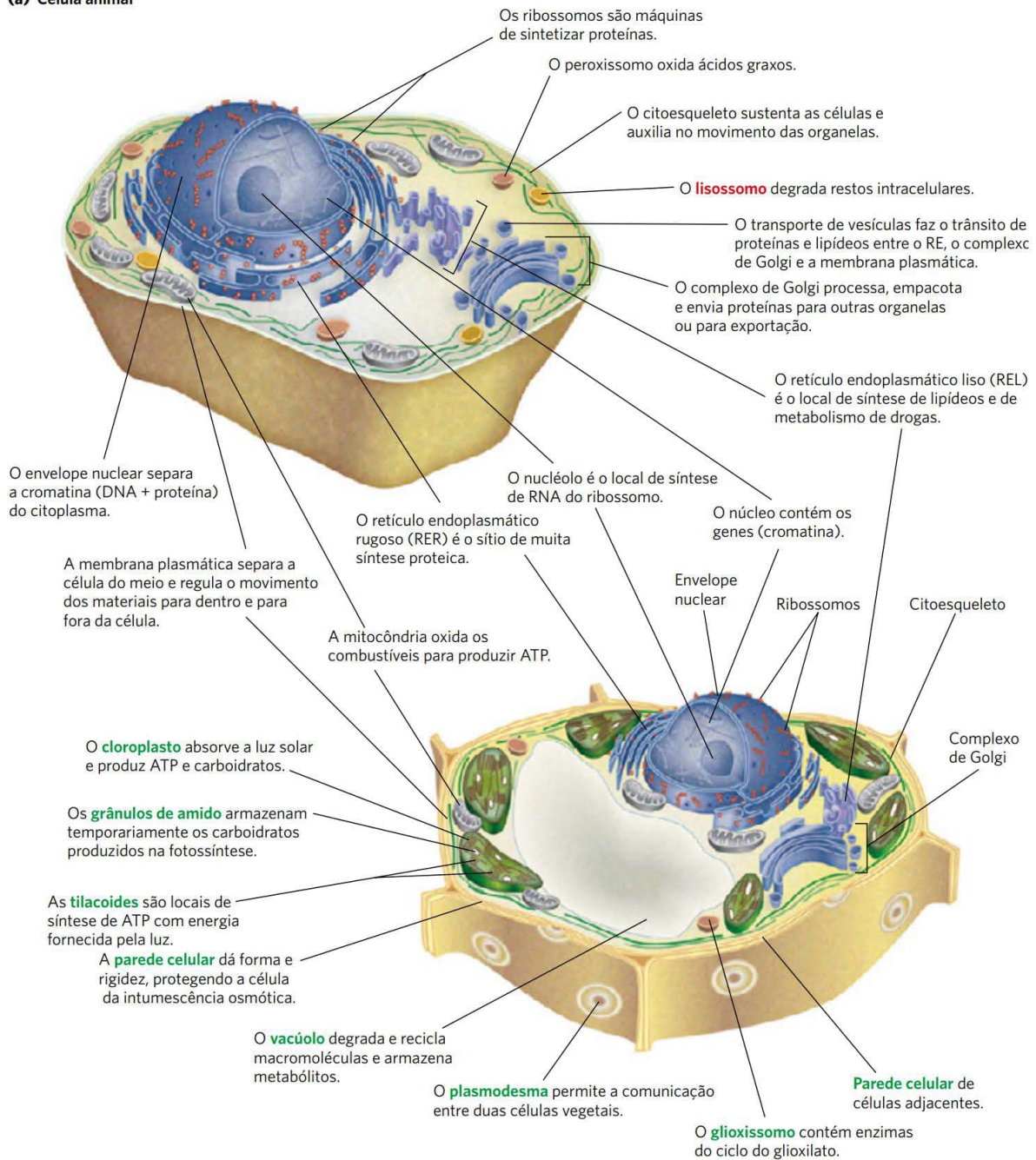
O citoplasma é organizado pelo citoesqueleto e é altamente dinâmico

A microscopia de fluorescência revelou vários tipos de filamentos proteicos atravessando a célula eucariótica em várias direções, formando uma rede tridimensional interligada, o **citoesqueleto**. Existem três tipos gerais de filamentos citoplasmáticos – filamentos de actina, microtúbulos e filamentos intermediários (Figura 1-10) – que diferem em largura (de 6 a 22 nm), composição e função específica. Todos eles conferem estrutura e organização ao citoplasma e forma à célula. Os filamentos de actina e os microtúbulos também auxiliam na movimentação das organelas e da célula inteira.

Cada tipo de componente do citoesqueleto é composto por subunidades proteicas simples que se associam de forma não covalente para formar filamentos de espessura uniforme. Esses filamentos não são estruturas permanentes, são constantemente desmontados pela dissociação de suas subunidades e remontados em filamentos. Sua localização na célula não é rigidamente fixa, podendo mudar drasticamente com a mitose, a citocinese, o movimento ameboide ou mudanças na forma da célula. A montagem, a desmontagem e a localização de todos os tipos de filamentos são reguladas por outras proteínas, as quais servem para ligar ou reunir os filamentos ou para mover as organelas citoplasmáticas ao longo dos filamentos. (Bactérias contêm proteínas tipo actina que desempenham funções semelhantes àsquelas das células.)

O quadro que emerge desse breve apanhado da estrutura da célula eucariótica é o de uma célula com uma trama de fibras estruturais e um sistema complexo de compartimentos envolvidos por membranas (Figura 1-8). Os filamentos se desmontam e se remontam em outro lugar. Vesículas providas de membrana brotam de uma organela e se fundem com outra. As organelas movem-se pelo citoplasma ao longo de filamentos proteicos e esse movimento é impulsionado por proteínas motoras dependentes de energia. O **sistema de endomembranas** separa processos metabólicos específicos e provê superfícies sobre as quais ocorrem determinadas reações catalisadas por enzimas. A **exocitose** e a **endocitose**, mecanismos de transporte (para fora e para dentro da célula, respectivamente) que envolvem fusão e fissão de membranas, proporcionam conexão entre o citoplasma e o meio circundante, possibilitando a secreção de substâncias produzidas na célula e a captação de materiais extracelulares.

(a) Célula animal



(b) Célula vegetal

FIGURA 1-8 Estrutura da célula eucariótica. Ilustrações esquemáticas dos dois principais tipos de célula eucariótica: (a) representação de célula animal e (b) representação de célula vegetal. Células vegetais geralmente têm de 10 a 100 μm de diâmetro – são maiores do que as células animais, que geralmente têm de 5 a 30 μm . As estruturas marcadas em vermelho são exclusivas de células animais, e as marcadas em verde, de células vegetais. Os microrganismos eucarióticos (como protistas e fungos) têm estruturas semelhantes às das células animais e vegetais, mas muitos também têm organelas especializadas, não ilustradas aqui.

Essa organização do citoplasma, embora complexa, está longe de ser aleatória. O movimento e o posicionamento das organelas e dos elementos do citoesqueleto estão sob firme regulação. Em determinados estágios da sua vida, a célula eucariótica é submetida a reorganiza-

ções drásticas, conduzidas com exatidão, como nos eventos da mitose. As interações entre o citoesqueleto e as organelas são não covalentes, são reversíveis e sujeitas à regulação em resposta a vários sinais intra e extracelulares.

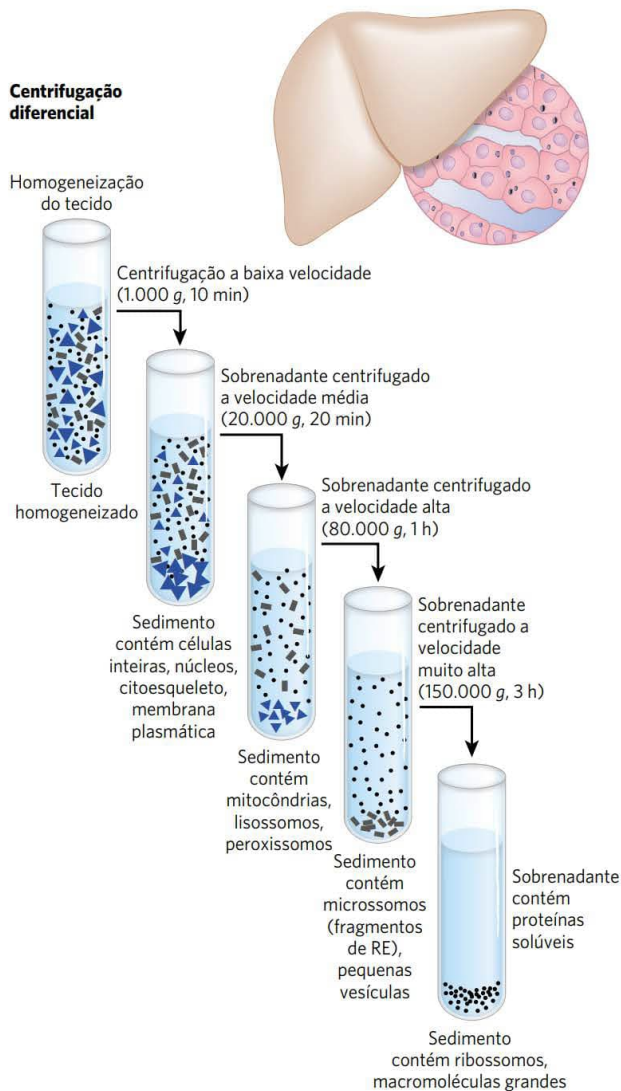
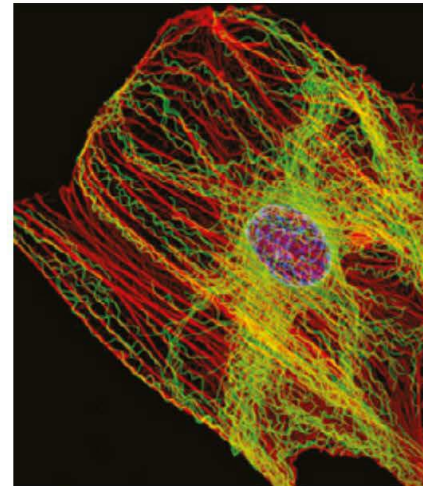


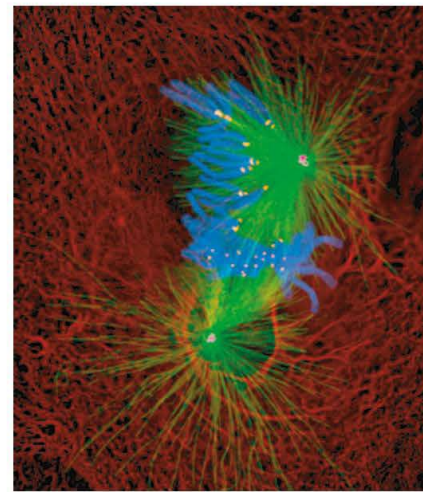
FIGURA 1-9 Fracionamento subcelular de tecidos. Inicialmente, um tecido como o hepático é homogeneizado mecanicamente para romper as células e dispersar o conteúdo em um tampão aquoso. O meio tamponado contém sacarose para manter uma pressão osmótica semelhante à das organelas, equilibrando, assim, a difusão da água para dentro e para fora das organelas, as quais intumesceriam e explodiriam em uma solução de osmolaridade mais baixa (ver Figura 2-13). As partículas grandes e pequenas em suspensão podem ser separadas por centrifugação em diferentes velocidades. As partículas maiores sedimentam com mais rapidez do que as partículas pequenas, e o material solúvel não sedimenta. Pela escolha cuidadosa das condições de centrifugação, as frações subcelulares podem ser separadas para determinar as respectivas características bioquímicas. [Fonte: informações de B. Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell*, 2ª ed., Garland Publishing, Inc., 1989, p. 165.]

As células constroem estruturas supramoleculares

As macromoléculas e as suas subunidades monoméricas diferem muito em tamanho (**Figura 1-11**). Uma molécula de alanina tem menos de 0,5 nm de comprimento. Uma molécula de hemoglobina, a proteína transportadora de oxigênio dos eritrócitos (células vermelhas do sangue), consiste em subunidades contendo cerca de 600 resíduos de aminoácidos



(a)



(b)

FIGURA 1-10 Os três tipos de filamentos do citoesqueleto: filamentos de actina, microtúbulos e filamentos intermediários. As estruturas celulares podem ser marcadas com um anticorpo (que reconheça determinada proteína) que tenha ligado (covalentemente) um composto fluorescente. As estruturas marcadas tornam-se visíveis quando a célula é observada sob microscópio de fluorescência. **(a)** Nesta cultura celular de fibroblastos, os feixes de filamentos de actina estão marcados em vermelho; os microtúbulos, em sentido radial a partir do centro da célula, estão marcados em verde; e os cromossomos (no núcleo), estão marcados em azul. **(b)** Célula jovem de pulmão em mitose. Os microtúbulos (em verde) ligados a estruturas chamadas de cinetócoros (em amarelo) nos cromossomos condensados (em azul) puxam os cromossomos para polos opostos, ou centrossomos (em magenta), da célula. Os filamentos intermediários, formados de queratina (em vermelho), mantêm a estrutura da célula. [Fontes: (a) James J. Faust e David G. Capco, Arizona State University/NIH National Institute of General Medical Sciences. (b) Dr. Alexey Khodjakov, Wadsworth Center, New York State Department of Health.]

em quatro longas cadeias, enoveladas em forma globular e associadas em uma estrutura de 5,5 nm de diâmetro. As proteínas, por sua vez, são muito menores do que os ribossomos (cerca de 20 nm de diâmetro), os quais, por sua vez, são menores do que organelas como as mitocôndrias, que

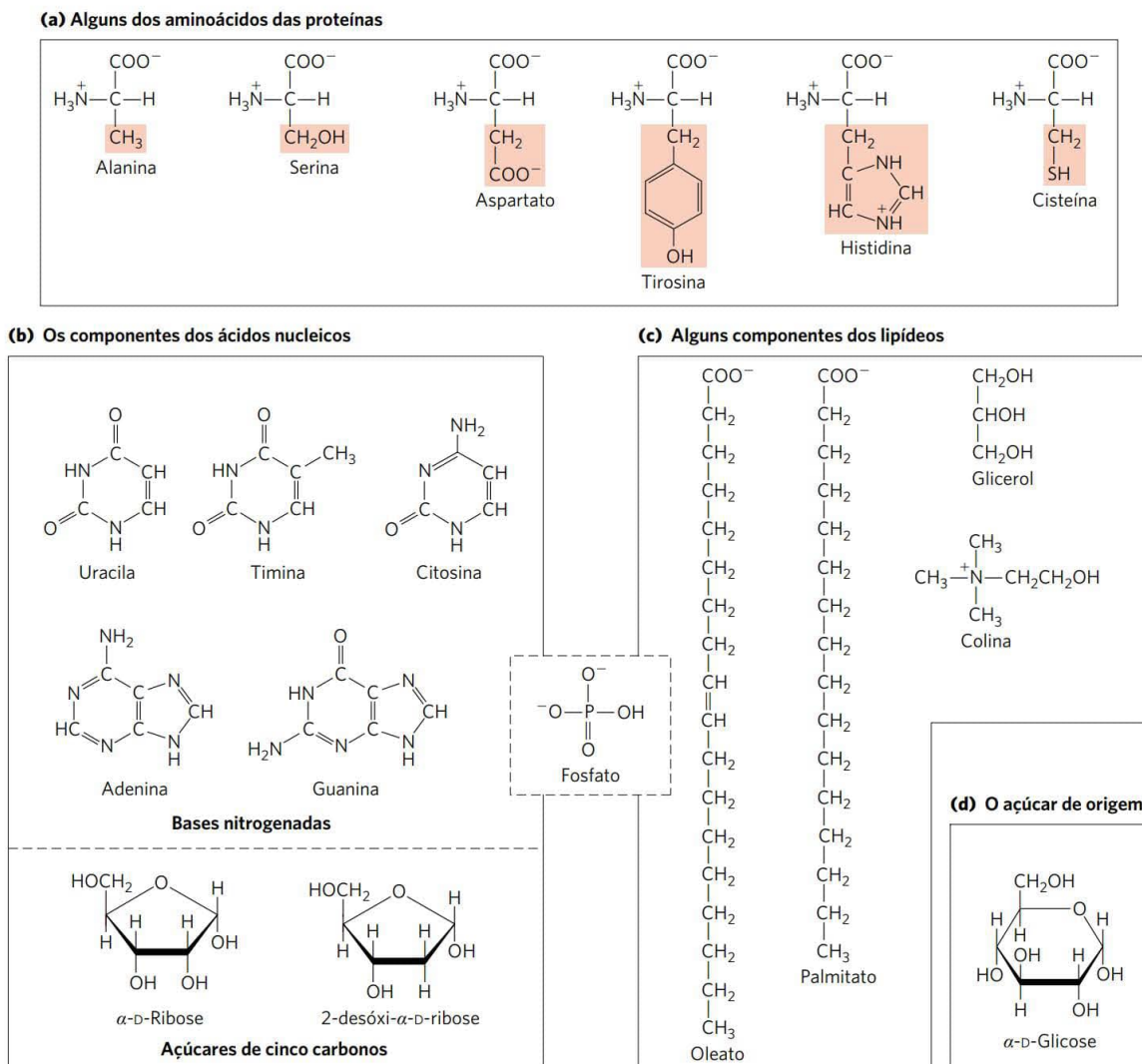


FIGURA 1-11 Os compostos orgânicos a partir dos quais é formada a maior parte dos materiais celulares: o ABC da bioquímica. Estão mostrados **(a)** seis dos 20 aminoácidos que formam todas as proteínas (as cadeias laterais estão sombreadas em vermelho); **(b)** as cinco bases nitrogenadas, os dois açúcares de cinco carbonos e os íons fosfato que formam os ácidos nucleicos; **(c)** cinco componentes dos lipídeos de membrana (incluindo o fosfato); e **(d)** D-glicose, o açúcar simples que forma a maioria dos carboidratos.

têm 1.000 nm de diâmetro. Entre as biomoléculas simples e as estruturas celulares que podem ser vistas ao microscópio óptico o salto é enorme. A **Figura 1-12** ilustra a hierarquia estrutural na organização celular.

As subunidades monoméricas das proteínas, dos ácidos nucleicos e dos polissacarídeos são unidas por ligações covalentes. Nos complexos supramoleculares, contudo, as macromoléculas são unidas por interações não covalentes – individualmente muito mais fracas do que as covalentes. Entre essas interações, estão as ligações de hidrogênio (entre grupos polares), as interações iônicas (entre grupos carregados), as interações hidrofóbicas (entre grupos apolares em solução aquosa) e as interações de van der Waals (forças de London) – todas elas com energia muito menor do que as ligações covalentes. Essas interações estão descritas no Capítulo 2. O grande número de interações

fracas entre as macromoléculas nos complexos supramoleculares estabiliza essas agregações, gerando suas estruturas características.

Estudos *in vitro* podem subestimar interações importantes entre moléculas

Uma abordagem para entender um processo biológico é o estudo *in vitro* de moléculas purificadas (“no vidro” – no tubo de ensaio), sem a interferência de outras moléculas presentes na célula intacta – isto é, *in vivo* (“no vivo”). Embora essa abordagem tenha sido muito esclarecedora, deve-se considerar que o interior de uma célula é totalmente diferente do interior de um tubo de ensaio. Os componentes “interferentes” eliminados na purificação podem ser cruciais para a função biológica ou para a regulação

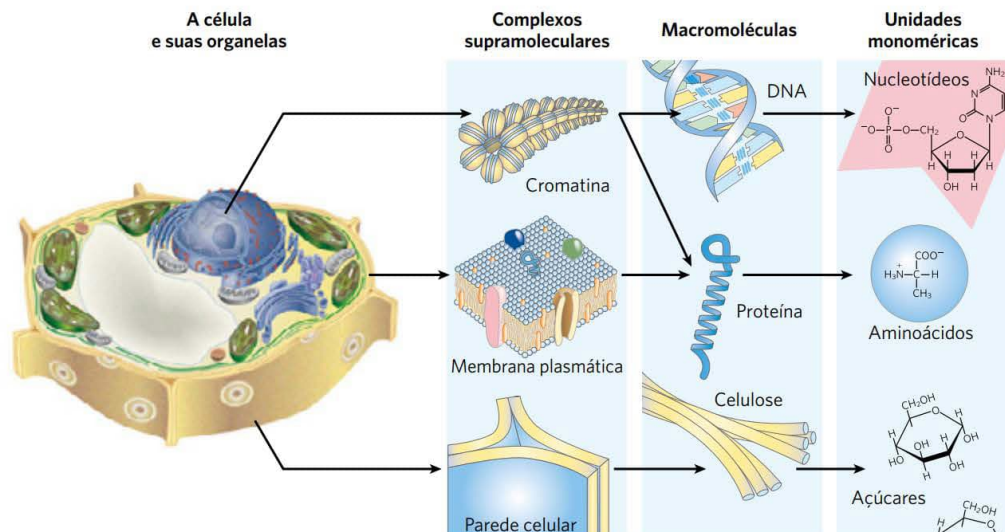


FIGURA 1-12 Hierarquia estrutural na organização molecular das células. As organelas e as demais estruturas relativamente grandes das células são feitas de complexos supramoleculares, que, por sua vez, são feitos de macromoléculas e de subunidades moleculares menores. Por exemplo, o núcleo desta célula vegetal contém cromatina, complexo supramolecular que consiste em DNA e proteínas (histonas). O DNA é feito de subunidades monoméricas simples (nucleotídeos), bem como de proteínas (aminoácidos). [Fonte: informações de W. M. Becker e D. W. Deamer, *The World of the Cell*, 2ª ed., Benjamin/Cummings Publishing Company, 1991, Fig. 2-15.]

da molécula purificada. Por exemplo, estudos *in vitro* de enzimas puras são comumente realizados com concentrações muito baixas da enzima em soluções aquosas sob agitação. Na célula, uma enzima está dissolvida ou suspensa no citosol com consistência gelatinosa junto com milhares de outras proteínas, e algumas delas se ligam à enzima e influenciam sua atividade. Algumas enzimas são componentes de complexos multienzimáticos, nos quais os reagentes passam de uma enzima para a outra, sem nunca passar para o solvente. Quando todas as macromoléculas conhecidas de uma célula são representadas em seus tamanhos e concentrações conhecidos (**Figura 1-13**), fica claro que o citosol é bem congestionado e que a difusão de macromoléculas dentro do citosol deve diminuir devido a colisões com outras estruturas grandes. Em resumo, certa molécula pode ter um comportamento muito diferente quando está em uma célula ou quando está *in vitro*. Um desafio central na bioquímica é entender as influências da organização celular e das associações macromoleculares sobre a função das enzimas individuais e outras biomoléculas para, então, entender a função *in vivo*, assim como *in vitro*.

RESUMO 1.1 Fundamentos das células

- Todas as células são delimitadas por uma membrana plasmática, têm um citosol contendo metabólitos, coenzimas, íons inorgânicos e enzimas e um conjunto de genes contidos dentro de um nucleóide (bactérias e arqueias) ou de um núcleo (eucariotos).
- Todos os organismos necessitam de uma fonte de energia para realizar trabalho celular. Os organismos fototróficos obtêm energia da luz solar; os quimiotróficos oxidam combustíveis químicos, transferindo elétrons

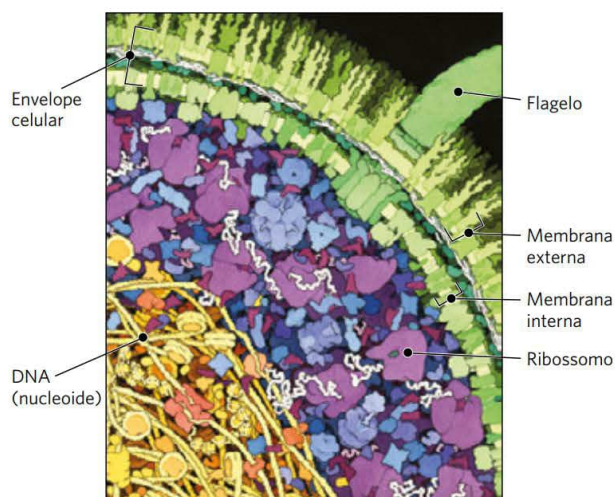


FIGURA 1-13 A célula lotada. Neste desenho de David Goodsell, os tamanhos relativos e o número de macromoléculas em uma pequena região da célula de *E. coli* estão representados com precisão. Este citosol concentrado, repleto de proteínas e ácidos nucleicos, é muito diferente de um extrato típico de células em estudos bioquímicos, em que o citosol é diluído muitas vezes, alterando em muito a interação entre as macromoléculas. [Fonte: © David S. Goodsell, 1999.]

para bons aceptores: compostos inorgânicos, compostos orgânicos ou oxigênio molecular.

- As células de bactérias e de arqueias têm citosol, nucleóide e plasmídeos contidos dentro de um envelope celular. As células eucarióticas têm núcleo e são multi-compartimentalizadas, com determinados processos segregados em organelas específicas; as organelas podem ser separadas e estudadas isoladamente.

- As proteínas do citoesqueleto organizam-se em longos filamentos que dão forma e rigidez às células e servem como trilhos ao longo dos quais as organelas celulares se deslocam por toda a célula.
- Complexos supramoleculares unidos por interações não covalentes são parte de uma hierarquia de estruturas, algumas delas visíveis ao microscópio óptico. Quando moléculas individuais são removidas desses complexos para serem estudadas *in vitro*, algumas interações importantes para uma célula viva podem ser perdidas.

1.2 Fundamentos químicos

A bioquímica tenta explicar as formas e as funções biológicas em termos químicos. No fim do século XVIII, os químicos concluíram que a composição da matéria viva é impressionantemente diferente daquela do mundo inanimado. Antoine-Laurent Lavoisier (1743-1794) percebeu a relativa simplicidade do “mundo mineral” e contrastou-a com a complexidade dos “mundos animal e vegetal”. Ele sabia que esses últimos eram constituídos de compostos ricos nos elementos carbono, oxigênio, nitrogênio e fósforo.

Durante a primeira metade do século XX, investigações bioquímicas conduzidas em paralelo sobre a oxidação da glicose em leveduras e células de músculo animal revelaram semelhanças químicas impressionantes entre esses dois tipos celulares aparentemente muito distintos, indicando que a queima da glicose, tanto em leveduras como em células musculares, envolve os mesmos 10 intermediários químicos e as mesmas 10 enzimas. Estudos posteriores sobre muitos outros processos químicos em diferentes organismos confirmaram a generalidade dessa observação, resumida, em 1954, por Jacques Monod: “O que vale para a *E. coli* também vale para um elefante”. O entendimento que temos hoje de que todos os organismos têm uma origem evolutiva comum tem base, em parte, nessa observação de que todos compartilhem dos mesmos processos e intermediários químicos, o que muitas vezes é denominado “unidade bioquímica”.

Entre os mais de 90 elementos químicos de ocorrência natural, menos de 30 são essenciais para os organismos. A maioria dos elementos da matéria viva tem um número atômico relativamente baixo; somente três têm números atômicos maiores do que o selênio, 34 (**Figura 1-14**). Os quatro elementos químicos mais abundantes nos or-

ganismos vivos, em termos de porcentagem do total de número de átomos, são hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e carbono, que, juntos, constituem mais de 99% da massa das células. Eles são os elementos mais leves capazes de formar de maneira eficiente uma, duas, três e quatro ligações; em geral, os elementos mais leves formam ligações mais fortes. Os microelementos constituem uma fração ínfima do peso do corpo humano, mas todos são essenciais à vida, geralmente por serem essenciais para a função de proteínas específicas, incluindo muitas enzimas. A capacidade de transporte de oxigênio da hemoglobina, por exemplo, é totalmente dependente de quatro íons ferro, que, somados, representam somente 0,3% da massa total da hemoglobina.

Biomoléculas são compostos de carbono com uma grande variedade de grupos funcionais

A química dos organismos vivos está organizada em torno do carbono, que contribui com mais da metade do peso seco das células. O carbono pode formar ligações simples com átomos de hidrogênio, assim como ligações simples e duplas com átomos de oxigênio e nitrogênio (**Figura 1-15**). A capacidade dos átomos de carbono de formar ligações simples estáveis com até quatro outros átomos de carbono tem uma importância biológica grande. Dois átomos de carbono também podem compartilhar dois (ou três) pares de elétrons, formando, assim, ligações duplas (ou triplas).

As quatro ligações simples que podem ser formadas pelo átomo de carbono se projetam a partir do núcleo, formando os quatro vértices de um tetraedro (**Figura 1-16**), com ângulo de aproximadamente 109,5° entre duas ligações quaisquer e comprimento médio de ligação de 0,154 nm. A rotação é livre em torno de cada ligação simples, a menos que grupos muito grandes ou altamente carregados estejam ligados aos átomos de carbono. Nesse caso, a rotação pode ser limitada. Já a ligação dupla é mais curta (cerca de 0,134 nm) e rígida, permitindo somente uma rotação limitada em torno do seu eixo.

Nas biomoléculas, átomos de carbono ligados covalentemente podem formar cadeias lineares, ramificadas e estruturas cíclicas. Aparentemente, a versatilidade do carbono em se ligar com outro carbono e com outros elementos foi o principal fator na seleção dos compostos de carbono para a maquinaria molecular das células durante a origem e a evolução dos organismos vivos. Nenhum outro elemento

1 H																	2 He													
3 Li	4 Be															5 B	6 C	7 N	8 O	9 F	10 Ne									
11 Na	12 Mg															13 Al	14 Si	15 P	16 S	17 Cl	18 Ar									
19 K	20 Ca	21 Sc	22 Ti	23 V	24 Cr	25 Mn	26 Fe	27 Co	28 Ni	29 Cu	30 Zn	31 Ga	32 Ge	33 As	34 Se	35 Br	36 Kr													
37 Rb	38 Sr	39 Y	40 Zr	41 Nb	42 Mo	43 Tc	44 Ru	45 Rh	46 Pd	47 Ag	48 Cd	49 In	50 Sn	51 Sb	52 Te	53 I	54 Xe													
55 Cs	56 Ba															72 Hf	73 Ta	74 W	75 Re	76 Os	77 Ir	78 Pt	79 Au	80 Hg	81 Tl	82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn
87 Fr	88 Ra																													

Elementos principais

Elementos-traço

Lantanídeos

Actinídeos

FIGURA 1-14 Elementos essenciais para a vida e a saúde dos animais. Os macroelementos (sombreados em vermelho) são componentes estruturais das células e dos tecidos e são necessários na dieta em uma quantidade de vários gramas por dia. Para os microelementos (sombreados em amarelo), as quantidades necessárias são muito menores: para o ser humano, são suficientes alguns miligramas por dia de Fe, Cu e Zn, e quantidades ainda menores dos demais elementos. As necessidades mínimas para plantas e microrganismos são semelhantes às mostradas aqui; o que varia são as maneiras pelas quais eles conseguem esses elementos.

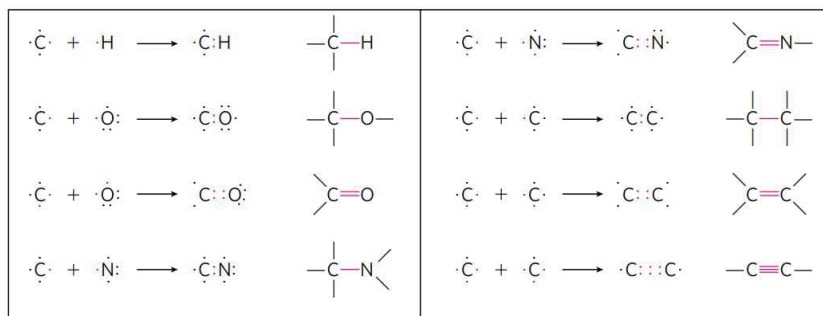


FIGURA 1-15 A versatilidade do carbono em formar ligações. O carbono pode formar ligações covalentes simples, duplas e triplas (indicadas em vermelho), particularmente com outros átomos de carbono. Ligações triplas são raras em biomoléculas.

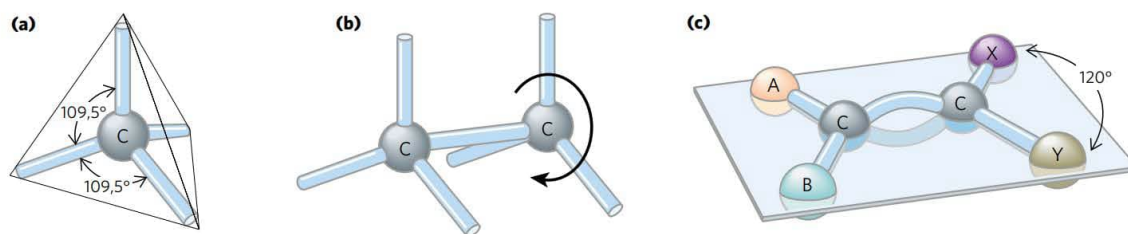


FIGURA 1-16 Geometria da ligação do carbono. (a) Os átomos de carbono têm um arranjo tetraédrico bem característico para as quatro ligações simples. (b) A ligação simples carbono-carbono tem liberdade de rotação, como mostrado para o composto etano ($\text{CH}_3\text{---CH}_3$). (c) Ligações duplas são mais curtas e não permitem rotação. Os dois carbonos ligados por ligação dupla e os átomos designados por A, B, X e Y estão todos em um mesmo plano rígido.

químico consegue formar moléculas com tanta diversidade de tamanho, forma e composição.

A maioria das biomoléculas pode ser considerada como derivados de hidrocarbonetos, tendo átomos de hidrogênio substituídos por uma grande gama de grupos funcionais que conferem propriedades químicas específicas à molécula, formando diversas famílias de compostos orgânicos. Exemplos comuns dessas biomoléculas são os alcoóis, que têm um ou mais grupos hidroxila; aminas, com grupos amina; aldeídos e cetonas, com grupos carbonila; e ácidos carboxílicos, com grupos carboxila (**Figura 1-17**). Muitas biomoléculas são polifuncionais, contendo dois ou mais tipos de grupos funcionais (**Figura 1-18**), cada qual com suas características

químicas e de reatividade. A “personalidade” química de um composto é determinada pela química do seu grupo funcional e como ele se situa no espaço tridimensional.

As células contêm um conjunto universal de moléculas pequenas

Existe um conjunto de aproximadamente mil moléculas orgânicas pequenas ($M_r \sim 100$ a ~ 500) diferentes dissolvidas na fase aquosa (citossol) das células, com concentração intracelular na faixa de nanomolar a milimolar (ver Figura 15-4). (Ver Quadro 1-1 para explicações sobre as várias maneiras de se referir às massas moleculares.) Esses são

QUADRO 1-1 Peso molecular, massa molecular e suas unidades corretas

Há duas maneiras comuns (e equivalentes) para descrever massa molecular, e as duas são usadas neste livro. A primeira é *peso molecular*, ou *massa molecular relativa*, denominada M_r . O peso molecular da substância é definido como a relação da massa da molécula da substância para um duodécimo da massa do carbono-12 (^{12}C). Visto que M_r é uma razão, ela é adimensional – não tem unidade associada. A segunda é a *massa molecular*, denominada m , simplesmente a massa da molécula, ou a massa molar, dividida pelo número de Avogadro. Essa massa molecular, m , é expressa em daltons (abreviado Da). Um dalton é equivalente a um duodécimo da massa do carbono-12; um quilodalton (kDa) é 1.000 daltons; um megadalton (MDa) é um milhão de daltons.

Considere-se, por exemplo, uma molécula com massa 1.000 vezes superior à da água. Pode-se dizer que essa molécula tem $M_r = 18.000$ ou $m = 18.000$ daltons. Pode-se também descrevê-la como uma “molécula com 18 kDa”. Entretanto, a expressão $M_r = 18.000$ daltons é incorreta.

Outra unidade conveniente para descrever a massa de um único átomo ou molécula é a unidade de massa atômica (antes denominada u.m.a., agora geralmente usada como u). Uma unidade de massa atômica (1 u) é definida como um duodécimo da massa do átomo do carbono 12. Experimentalmente, a medida da massa de um átomo de carbono-12 é $1,9926 \times 10^{-23}$ g, então $1 \text{ u} = 1,6606 \times 10^{-24}$ g. A unidade de massa atômica é conveniente para descrever a massa dos picos observados em espectrometria de massas (ver Capítulo 3, p. 100).

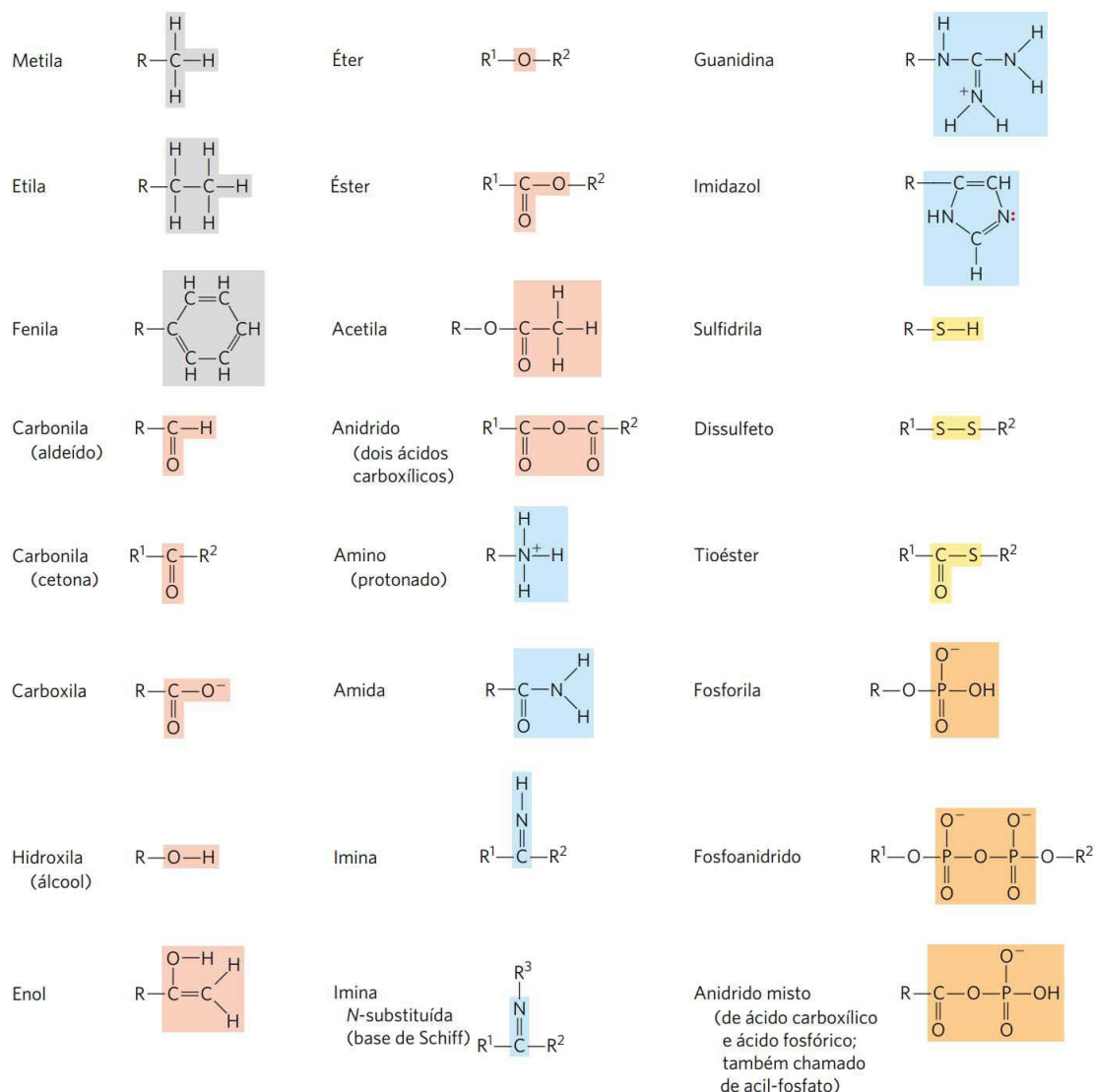


FIGURA 1-17 Alguns grupos funcionais comuns em biomoléculas. Os grupos funcionais estão identificados com uma cor usada para o elemento que caracteriza aquele grupo: cinza para C, vermelho para O, azul para N, amarelo para S e cor de laranja para P. Nesta figura e em todo o livro, será usado R para representar “qualquer substituinte”. Um grupo funcional pode ser tão simples como um átomo de hidrogênio, mas geralmente é um grupo contendo carbono. Quando dois ou mais substituintes são mostrados em uma molécula, serão designados como R¹, R², e assim por diante.

os metabólitos centrais das principais vias metabólicas que ocorrem em quase todas as células – isto é, os metabólitos e as vias metabólicas que foram conservados durante o curso da evolução. Esse conjunto de moléculas inclui os aminoácidos comuns, os nucleotídeos, os açúcares e seus derivados fosforilados e os ácidos mono, di e tricarboxílicos. As moléculas podem ser polares ou carregadas, e são solúveis em água. Essas moléculas ficam aprisionadas no interior das células porque a membrana plasmática é impermeável a elas; entretanto, transportadores de membrana específicos podem catalisar o deslocamento de algumas moléculas para dentro e para fora da célula, ou entre compartimentos nas células eucarióticas. A ocorrência universal do mesmo conjunto de compostos nas células vivas reflete a conservação

evolutiva das vias metabólicas que se desenvolveram nas células primitivas.

Existem outras biomoléculas pequenas que são específicas de certos tipos de células ou organismos. Por exemplo, plantas vasculares contêm, além do conjunto universal, moléculas pequenas, chamadas de **metabólitos secundários**, que exercem funções específicas para a vida da planta. Esses metabólitos incluem compostos que dão às plantas seus aromas e cores característicos, e compostos como morfina, quinino, nicotina e cafeína, que são apreciados pelos seus efeitos fisiológicos sobre o ser humano, mas usados para outros propósitos pelas plantas.

O conjunto completo de moléculas pequenas em uma dada célula sob um conjunto específico de condições tem

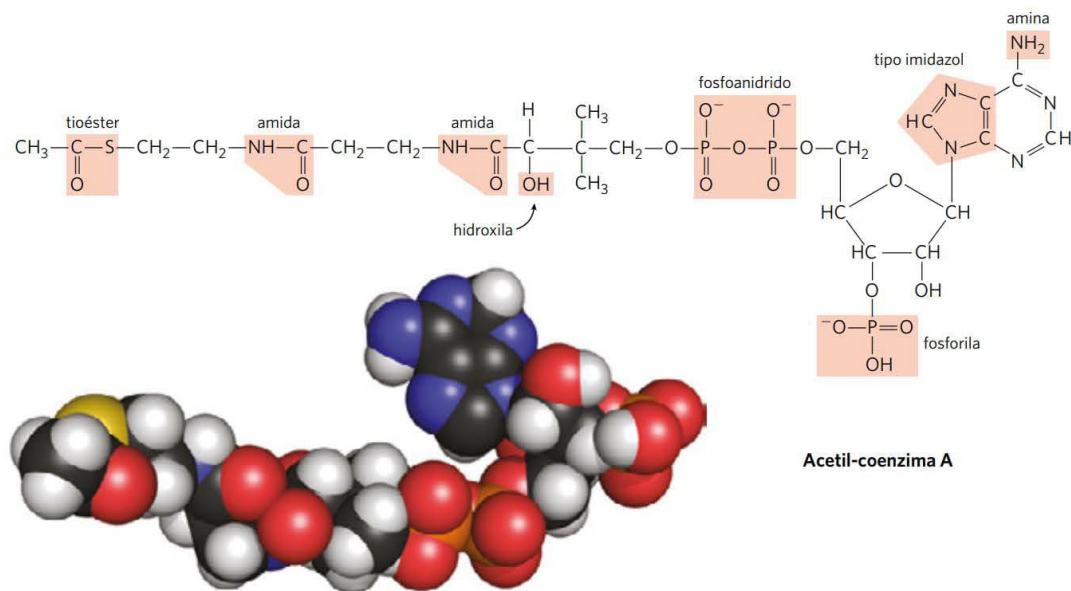


FIGURA 1-18 Vários grupos funcionais comuns em uma única biomolécula. Acetil-coenzima A (frequentemente abreviada como acetil-CoA) é um carreador de grupos acetila em algumas reações enzimáticas. Os grupos funcionais estão indicados na fórmula estrutural. Como será visto no Capítulo 2, alguns desses grupos funcionais podem existir nas formas protonada ou não protonada, dependendo do pH. No modelo de volume atômico, N é mostrado em azul, C em preto, P em cor de laranja, O em vermelho e H em branco. O átomo amarelo no lado esquerdo é o enxofre da ligação tioéster, ligação entre a parte acetila e coenzima A. [Fonte: Acetil-CoA extraída de PDB ID 1DM3, Y. Modis e R. K. Wierenga, *J. Mol. Biol.* 297:1171, 2000.]

sido chamado de **metaboloma**, em analogia ao termo “genoma”. **Metabolômica** é a caracterização sistemática do metaboloma sob condições bem específicas (como após a administração de um fármaco ou de um sinal biológico como insulina).

As macromoléculas são os principais constituintes das células

Muitas moléculas biológicas são **macromoléculas**, polímeros com peso molecular acima de ~ 5.000 montados a partir de precursores relativamente simples. Polímeros mais curtos são chamados de **oligômeros** (do grego, *oligos*, “poucos”). Proteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos são macromoléculas feitas de monômeros com pesos moleculares de 500 ou menos. A síntese de macromoléculas é a atividade que mais consome energia nas células. As macromoléculas podem, ainda, sofrer processamentos adicionais que resultam em complexos supramoleculares, formando unidades funcionais como os ribossomos. A Tabela 1-1 mostra as principais classes de biomoléculas em uma célula de *E. coli*.

As **proteínas**, que são polímeros longos de aminoácidos, constituem a maior parte (além da água) da célula. Algumas proteínas têm atividade catalítica e funcionam como enzimas; outras servem como elementos estruturais, receptores de sinal ou transportadores que carregam substâncias específicas para dentro ou para fora das células. As proteínas são, talvez, as mais versáteis de todas as biomoléculas; uma lista com toda a enormidade de funções das proteínas seria muito longa. O conjunto de todas as proteínas em funcionamento em determinada célula é chamado de **proteoma** da célula, e **proteômica** é a caracterização sistemática de to-

das as proteínas observadas em um conjunto específico de condições. Os **ácidos nucleicos**, DNA e RNA, são polímeros de nucleotídeos. Eles armazenam e transmitem a informação genética, e algumas moléculas de RNA apresentam também função estrutural e catalítica em complexos supramoleculares. **Genoma** é a sequência completa do DNA da

TABELA 1-1 Componentes moleculares de uma célula de *E. coli*

	Porcentagem em relação ao peso total da célula	Número aproximado de espécies moleculares diferentes
Água	70	1
Proteínas	15	3.000
Ácidos nucleicos		
DNA	1	1-4
RNA	6	> 3.000
Polissacarídeos	3	20
Lipídeos	2	50 ^a
Subunidades monoméricas e intermediárias	2	2.600
Íons inorgânicos	1	20

Fonte: A. C. Guo et al., *Nucleic Acids Res.* 41:D625, 2013.

^aEsse número é muito maior caso se considere todas as permutações e combinações de ácidos graxos substituintes.

célula (ou no caso de RNA viral, o seu RNA), e **genômica** é a caracterização da estrutura comparativa, função, evolução e mapeamento dos genomas. Os **polissacarídeos**, polímeros de açúcares simples como a glicose, apresentam três funções principais: armazenamento de combustível de alto conteúdo energético, componentes estruturais rígidos da parede celular (em plantas e bactérias) e elementos no reconhecimento extracelular que se ligam a proteínas de outras células. Polímeros mais curtos de açúcares (oligosacarídeos) ligados a proteínas ou lipídeos na superfície da célula servem como sinais celulares específicos. O **glicoma** da célula é o conjunto de todas as moléculas contendo carboidratos. Os **lipídeos**, derivados de hidrocarbonetos e insolúveis em água, servem como componentes estruturais das membranas, depósitos de combustível de alto conteúdo energético, pigmentos e sinais intracelulares. O conjunto de todas as moléculas contendo lipídeos em uma célula constitui o seu **lipidoma**. Com a aplicação de métodos sensíveis e com elevado poder de resolução (p. ex., espectrometria de massas), é possível identificar e quantificar centenas e milhares desses componentes e, portanto, quantificar o quanto variam em resposta às alterações das condições, sinais ou drogas. Biologia de sistemas é uma abordagem que tenta integrar a informação de genômica, proteômica, glicômica e lipidômica para fazer uma descrição molecular de todas as atividades da célula sob determinado conjunto de condições e entender as mudanças que ocorrem quando o sistema é perturbado por sinais externos, por certas situações ou por mutações.

Proteínas, polinucleotídeos e polissacarídeos apresentam um grande número de subunidades monoméricas e, como consequência, alto peso molecular – na faixa de 5.000 até mais de 1 milhão para proteínas, até vários *bilhões* para ácidos nucleicos e milhões para polissacarídeos como o amido. Individualmente, as moléculas de lipídeos são muito menores (M_r 750 a 1.500) e não são classificadas como macromoléculas, embora elas possam se associar de forma não covalente em estruturas muito grandes. Membranas celulares são formadas por grandes agregados não covalentes de moléculas de lipídeos e proteínas.

Dada a riqueza de informações embutida nas sequências de subunidades características, as proteínas e os ácidos nucleicos são muitas vezes classificados como **macromoléculas informacionais**. Alguns oligossacarídeos, como observado anteriormente, também atuam como moléculas informacionais.

A estrutura tridimensional é descrita pela configuração e pela conformação

As ligações covalentes e os grupos funcionais das biomoléculas são, obviamente, essenciais para o seu funcionamento, como também o arranjo dos constituintes atômicos das moléculas no espaço tridimensional – isto é, sua estereoquímica. Compostos contendo carbono normalmente existem como **estereoisômeros**, moléculas com as mesmas ligações químicas e mesma fórmula molecular, mas com diferentes **configurações** (arranjo fixo dos átomos no espaço). Interações entre biomoléculas são invariavelmente **estereoespecíficas**, e isso exige configurações específicas das moléculas para interagirem entre si.

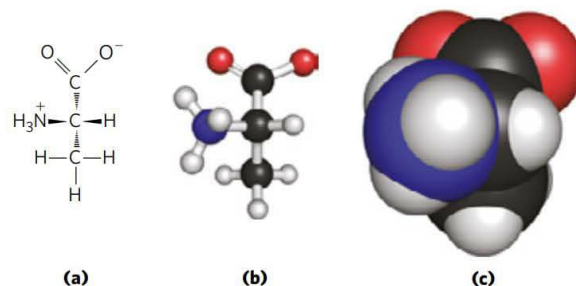


FIGURA 1-19 Representações das moléculas. Três maneiras de representar a estrutura do aminoácido alanina (mostrado na forma iônica encontrada em pH neutro). **(a)** Fórmula estrutural em perspectiva: uma cunha sólida (—) representa uma ligação na qual o átomo se projeta para fora do plano do papel, na direção do leitor; a cunha tracejada (---) representa a ligação estendida para trás do plano do papel. **(b)** Modelo de esfera e bastão, mostrando os comprimentos relativos das ligações e os ângulos das ligações. **(c)** Modelo de volume atômico, no qual cada átomo é mostrado com seu raio de van der Waals relativo correto.

A **Figura 1-19** mostra três maneiras de ilustrar a estereoquímica, ou configuração, das moléculas simples. Diagramas em perspectiva especificam a estereoquímica de forma inequívoca, mas o ângulo das ligações e os comprimentos das ligações centro a centro são mais bem representados pelo modelo de esfera e bastão. No modelo de volume atômico, o raio de cada “átomo” é proporcional ao seu raio de van der Waals, e os contornos do modelo definem o espaço ocupado pela molécula (o volume do espaço no qual os átomos das outras moléculas não podem entrar).

A configuração é conferida pela presença de (1) ligações duplas, em torno das quais existe pouca ou nenhuma liberdade de rotação, ou (2) pela presença de centros quirais, em torno dos quais grupos substituintes são arranjados em uma orientação específica. A característica que permite identificar estereoisômeros é o fato de que um não pode ser convertido no outro sem romper temporariamente uma ou mais ligações covalentes. A **Figura 1-20a** mostra a configuração do ácido maleico e seu isômero, ácido fumárico. Esses compostos são **isômeros geométricos**, ou **isômeros cis-trans**, que diferem no arranjo dos grupos substituintes com respeito à ligação dupla rígida (não pode girar) (do latim, *cis*, “neste lado” – grupos do mesmo lado da ligação dupla; *trans*, “através de” – grupos em lados opostos). O ácido maleico (maleato no pH neutro do citoplasma) é o isômero *cis*, e o ácido fumárico (fumarato), o isômero *trans*; cada um dos compostos é bem definido e eles podem ser separados um do outro, cada um possuindo propriedades químicas únicas. Um sítio de ligação (p. ex., em uma enzima) complementar a uma dessas moléculas não será complementar à outra, o que explica por que esses dois compostos têm papéis biológicos distintos apesar da constituição química similar.

No segundo tipo de estereoisômeros, os quatro diferentes substituintes ligados a um átomo de carbono tetraédrico podem ser arranjados em duas formas espaciais diferentes no espaço – isto é, possuem duas configurações –, produzindo dois estereoisômeros com propriedades químicas semelhantes ou idênticas, porém diferindo em determinadas propriedades físicas e biológicas. Um átomo de carbono com

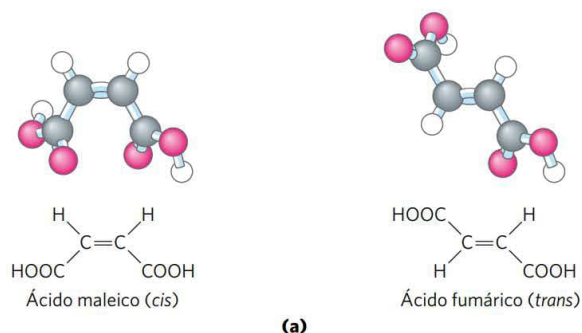
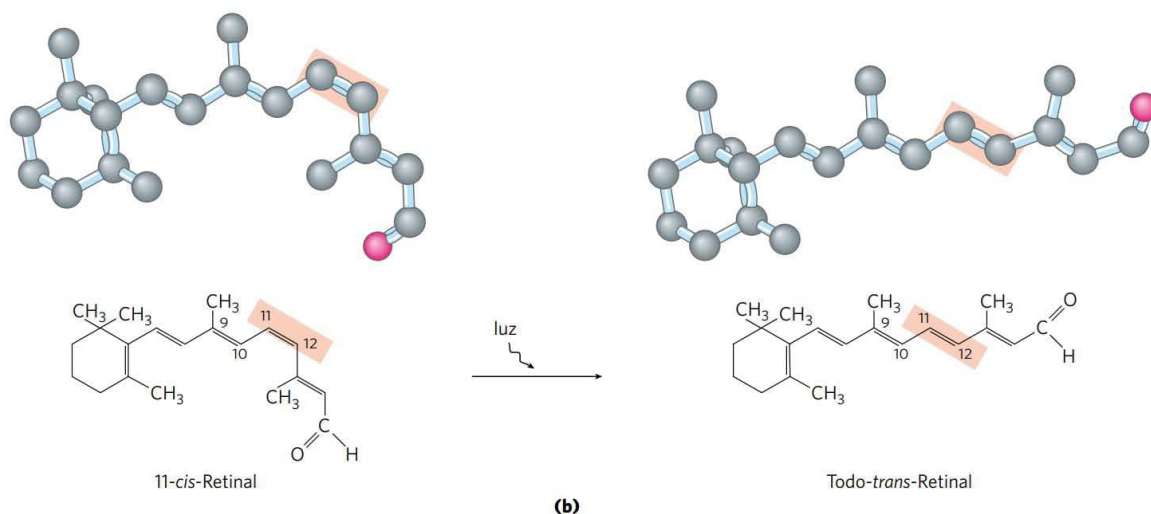


FIGURA 1-20 Configuração de isômeros geométricos. (a) Isômeros como o ácido maleico (maleato em pH 7) e o ácido fumárico (fumarato) não podem ser convertidos um no outro sem quebrar ligações covalentes, o que requer o gasto de muito mais energia do que a média da energia cinética das moléculas a temperaturas fisiológicas. (b) Na retina dos vertebrados, o evento inicial na detecção de luz é a absorção da luz visível por 11-*cis*-retinal. A energia da luz absorvida (em torno de 250 kJ/mol) converte 11-*cis*-retinal em todo-*trans*-retinal, provocando mudanças na célula da retina que desencadeiam o impulso nervoso. (Observe que os átomos de hidrogênio são omitidos nos modelos de esfera e bastão.)



quatro substituintes diferentes é considerado assimétrico, e carbonos assimétricos são denominados **centros quirais** (do grego, *chiro*, “mão”; alguns estereoisômeros estão relacionados estruturalmente da mesma forma que a mão direita está relacionada com a esquerda). Uma molécula com

somente um carbono quiral pode ter dois estereoisômeros; quando dois ou mais (n) carbonos quirais estão presentes, então podem existir 2^n estereoisômeros. Estereoisômeros que são imagens especulares um do outro são chamados de **enantiômeros** (Figura 1-21). Pares de estereoisômeros

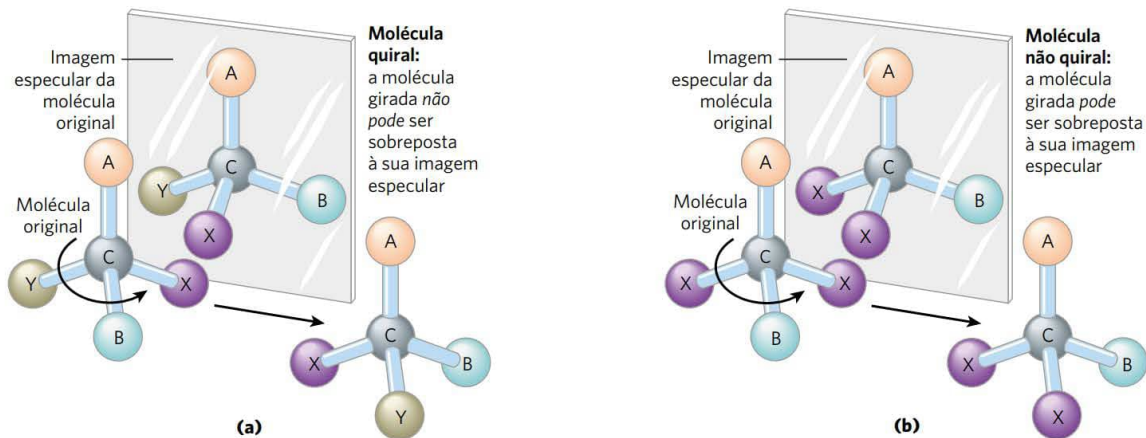


FIGURA 1-21 Assimetria molecular: moléculas quirais e não quirais. (a) Quando um átomo de carbono tem quatro grupos substituintes diferentes (A, B, X, Y), estes podem estar arranjados de duas maneiras, que são imagens especulares não sobreponíveis (enantiômeros). O átomo de carbono assimétrico é chamado de átomo quiral ou centro quiral. (b) Quando um carbono tetraédrico tem somente três grupos diferentes (i.e., o mesmo grupo ocorre duas vezes), somente uma configuração é possível, e a molécula é simétrica ou não quiral. Neste caso, a imagem da molécula se sobrepõe à sua imagem no espelho: a molécula do lado esquerdo pode girar no sentido anti-horário (quando vista de cima para baixo na direção da ligação de A com C) para formar a molécula vista no espelho.

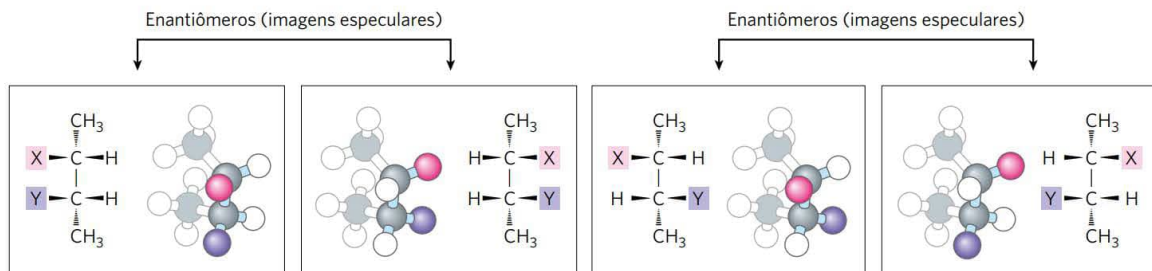


FIGURA 1-22 Enantiômeros e diastereoisômeros. Existem quatro diferentes estereoisômeros de 2,3-butano com duas substituições ($n = 2$ carbonos assimétricos, consequentemente $2n = 4$ estereoisômeros). Cada um deles está mostrado em um retângulo com a fórmula em perspectiva e com o modelo de esfera e bastão, que foi girado para a visualização de todos os grupos. Dois pares de estereoisômeros são imagens especulares um do outro, isto é, enantiômeros. Outros pares não são imagens especulares, sendo diastereoisômeros. [Fonte: informações de F. Carroll, *Perspectives on Structure and Mechanism in Organic Chemistry*, Brooks/Cole Publishing Co., 1998, p. 63.]

que não são imagens especulares um do outro são chamados de **diastereoisômeros** (Figura 1-22).

Louis Pasteur observou pela primeira vez, em 1843, (Quadro 1-2) que os enantiômeros têm reatividades químicas quase idênticas, mas diferem em uma propriedade física bem característica: sua interação com a luz polarizada. Em soluções separadas, dois enantiômeros giram o plano da luz polarizada em direções opostas, mas uma solução contendo concentrações equimolares de cada enantiômero (**mistura racêmica**) mostra atividade óptica rotatória nula. Compos-

tos sem centros quirais não causam a rotação do plano de polarização da luz plano-polarizada.

>> Convenção-chave: dada a importância da estereoquímica nas reações entre biomoléculas (ver adiante), os bioquímicos são obrigados a dar nome e a representar a estrutura de cada biomolécula de forma a não deixar qualquer dúvida sobre a estereoquímica. Para compostos com mais de um centro quiral, a nomenclatura mais usada é a do sistema RS. Nesse sistema, a cada grupo funcional ligado a um carbono

QUADRO 1-2 Louis Pasteur e atividade óptica: *In Vino, Veritas*

Louis Pasteur descobriu o fenômeno da atividade óptica em 1843, durante sua investigação sobre os sedimentos cristalinos que se acumulavam nos barris de vinho (forma de ácido tartárico, chamado de ácido paratartárico – também chamado de ácido racêmico, do latim, *racemus*, “cacho de uvas”). Ele usou pinças muito finas para separar dois tipos de cristais idênticos em forma, mas com imagem especular um do outro. Os dois tipos de cristal têm todas as propriedades químicas do ácido tartárico, mas em solução um tipo gira a luz plano-polarizada para a esquerda (levorrotatório) e o outro para a direita (dextrorrotatório). Posteriormente, Pasteur descreveu o experimento e sua interpretação:

Em estruturas isoméricas, os elementos e as proporções nas quais eles estão combinados são os mesmos, somente o arranjo dos átomos é diferente. Sabe-se, por um lado, que os arranjos moleculares dos dois ácidos tartáricos são assimétricos, e, por outro lado, que esses arranjos são absolutamente idênticos, exceto que exibem assimetria em direções opostas. Estariam os átomos do ácido dextro agrupados em forma de espiral dextrógira? Ou estariam dispostos nas arestas de um tetraedro irregular? Ou esta-



Louis Pasteur 1822-1895
[Fonte: The Granger Collection.]

riam dispostos em um ou outro arranjo assimétrico citado? Não se sabe.*

Agora sabemos. Estudos de cristalografia por raios X em 1951 confirmaram que as formas levorrotatória e dextrorrotatória do ácido tartárico são imagens especulares uma da outra no nível molecular e determinaram a configuração absoluta de cada uma (Figura Q-1). A mesma abordagem foi usada para demonstrar que, embora o aminoácido alanina tenha duas formas estereoisoméricas (designadas D e L), nas proteínas a alanina existe exclusivamente em uma forma (o isômero L; ver Capítulo 3).

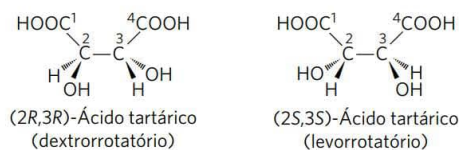
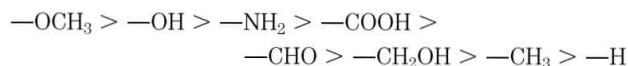


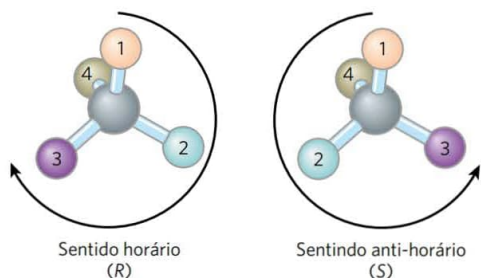
FIGURA Q-1 Pasteur separou cristais de dois estereoisômeros de ácido tartárico e mostrou que soluções contendo apenas uma das formas separadamente fazem girar luz polarizada na mesma magnitude, porém em direções opostas. Foi demonstrado mais tarde que as formas dextrorrotatória e levorrotatória são os isômeros (*R,R*) e (*S,S*) representados aqui. O sistema de nomenclatura RS está explicado no texto.

*Da palestra de Pasteur na Société Chimique de Paris, em 1883, citado em DuBos, R. (1976) *Louis Pasteur: Free Lance of Science*, p. 95, Charles Scribner's Sons, New York.

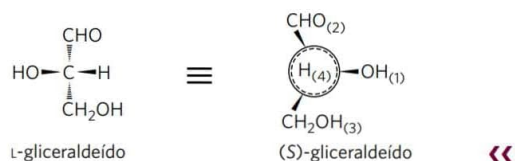
quiral é designada uma escala de *prioridade*. As prioridades de alguns substituintes comuns são:



No sistema de nomenclatura RS, o átomo quiral é visto com o grupo de mais baixa prioridade (grupo 4 no diagrama seguinte) apontando para trás da página, visto do observador. Se a prioridade dos outros três grupos (1 a 3) decresce no sentido horário, então a configuração é (*R*) (do latim, *rectus*, “direito”); se decresce no sentido anti-horário, então a configuração é (*S*) (do latim, *sinister*, “esquerdo”). Dessa maneira, cada carbono quiral é designado como (*R*) ou (*S*), e a inclusão dessas designações no nome do composto fornece uma descrição que não deixa dúvida sobre a estereoquímica de cada centro quiral.



Outro sistema de nomenclatura para estereoisômeros, o sistema D e L, é descrito no Capítulo 3. A molécula com um centro quiral único (p. ex., os dois isômeros de gliceraldeído) pode ser identificada sem deixar margem à dúvida por qualquer um dos sistemas.



Já a **conformação** molecular é diferente da configuração molecular, pois os grupos são livres para assumir diferentes posições no espaço, sem quebrar nenhuma ligação, devido à liberdade de rotação em torno das ligações simples. Em hidrocarbonetos simples, como o etano, por exemplo, há quase completa liberdade de rotação em torno da ligação C—C. Muitas conformações diferentes e interconvertíveis de etano são possíveis, dependendo do grau de rotação (**Figura 1-23**). Contudo, duas conformações são de especial interesse: a escalonada, que é mais estável do que qualquer uma das outras e, portanto, a predominante, e a eclipsada, que é a menos estável. Essas duas formas conformacionais não podem ser isoladas uma da outra, pois estão livremente se interconvertendo. Entretanto, a substituição de um ou mais átomos de hidrogênio em cada carbono por um grupo funcional que seja muito grande ou carregado eletricamente restringe a liberdade de rotação em torno da ligação C—C. Isso limita o número de conformações estáveis dos derivados do etano.

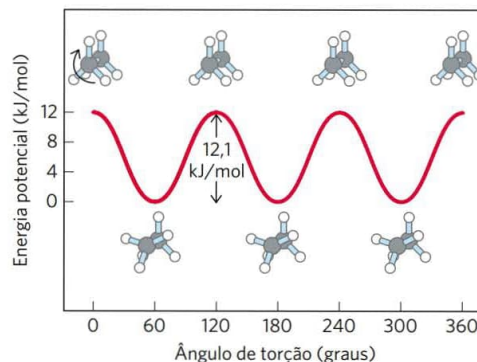


FIGURA 1-23 Conformações. Muitas conformações do etano são possíveis devido à liberdade de rotação em torno da ligação C—C. No modelo de esfera e bastão, quando o átomo de carbono frontal (sob o ponto de vista do leitor) é girado com seus três hidrogênios em relação ao átomo de carbono de trás, a energia potencial da molécula aumenta ao máximo na forma completamente eclipsada (nos ângulos de 0°, 120°, etc.) e depois diminui ao mínimo na forma totalmente escalonada (ângulos de torção de 60°, 180°, etc.). As formas eclipsada e escalonada não podem ser isoladas uma da outra porque as diferenças de energia para permitir uma interconversão muito rápida entre as duas formas (milhões de vezes por segundo) são muito pequenas.

As interações entre as biomoléculas são estereoespecíficas

Quando biomoléculas interagem, o “encaixe” entre elas tem de ser estereoquimicamente correto. A estrutura de biomoléculas grandes e pequenas (a combinação de configuração e conformação) é de máxima importância para as interações biológicas: um reagente com a respectiva enzima, um hormônio com seu receptor na superfície da célula e um antígeno com seu anticorpo específico, por exemplo (**Figura 1-24**). O estudo da estereoquímica das biomoléculas, com métodos físicos precisos, é uma parte

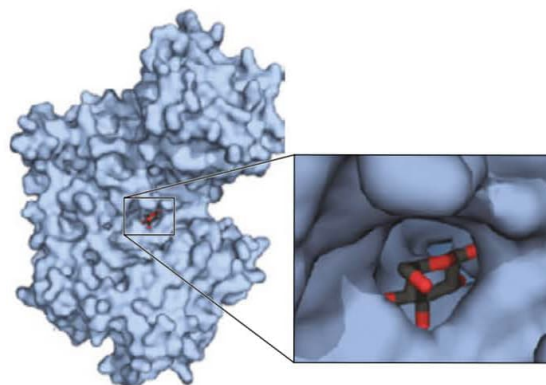


FIGURA 1-24 Encaixe complementar entre macromolécula e uma molécula pequena. A molécula de glicose encaixa-se em uma cavidade na superfície da enzima hexocinase (PDB ID 3B8A) e é mantida nesta orientação por várias interações não covalentes entre a proteína e o açúcar. Esta representação da molécula de hexocinase foi produzida com o auxílio de um *software* que calcula a forma da superfície externa de uma macromolécula, definida pelo raio de van der Waals de todos os átomos da molécula ou pelo método do “volume de exclusão do solvente”, que é o volume em que uma molécula de água não consegue penetrar. [Fonte: PDB ID 3B8A, P. Kuser et al., *Proteins* 72:731, 2008.]

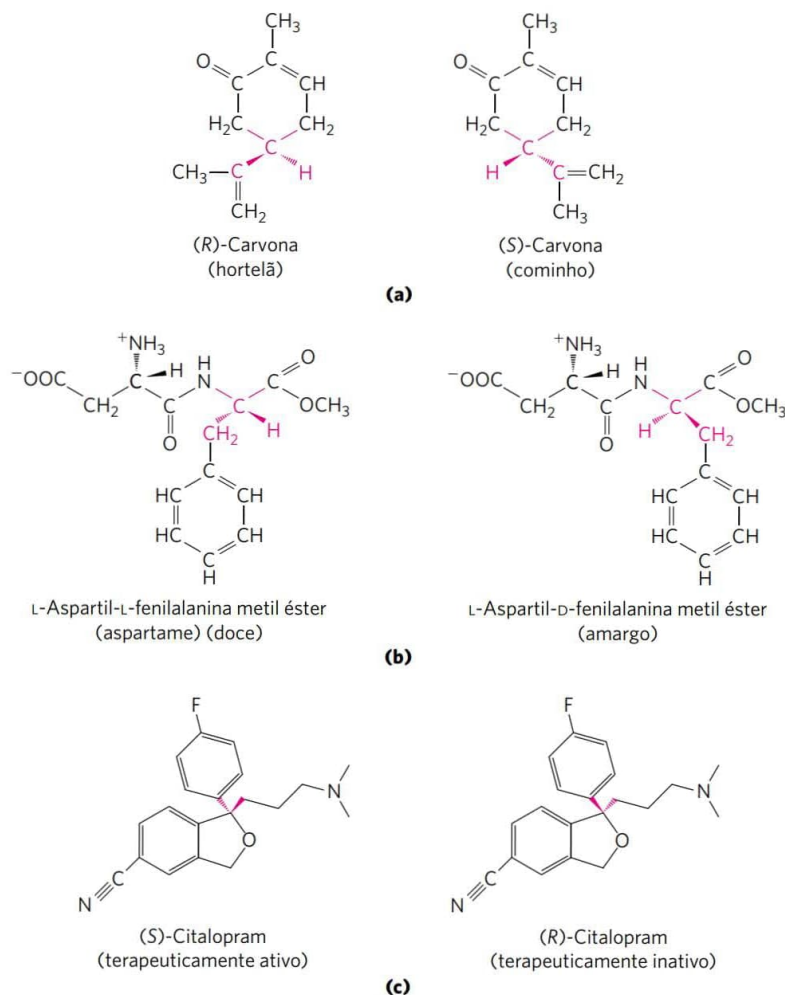


FIGURA 1-25 Estereoisômeros têm diferentes efeitos no ser humano. **(a)** Dois estereoisômeros de carvona: *(R)*-carvona (isolado do óleo de hortelã) têm o cheiro característico da hortelã; *(S)*-carvona (isolado do óleo de sementes de cominho) tem o cheiro de cominho. **(b)** O aspartame, adoçante artificial, é facilmente distinguível pelos receptores gustativos do seu estereoisômero de gosto amargo, apesar de os dois diferirem apenas pela configuração em um dos seus dois carbonos quirais. **(c)** O medicamento anti-depressivo citalopram (nome comercial Celexa), inibidor seletivo da recaptação da serotonina, é uma mistura racêmica dos dois estereoisômeros, mas somente *(S)*-citalopram tem efeito terapêutico. A preparação estereoquimicamente pura de *(S)*-citalopram (oxalato de citalopram) é vendida sob o nome comercial de Lexapro. Como se pode prever, a dose efetiva de Lexapro é a metade da dose efetiva de Celexa.

importante da pesquisa moderna da estrutura celular e da função bioquímica.

Nos seres vivos, as moléculas quirais normalmente estão presentes apenas em uma das suas formas quirais. Por exemplo, nas proteínas os aminoácidos ocorrem somente como isômeros L e a glicose ocorre somente como isômero D. (As convenções para a denominação de estereoisômeros de aminoácidos estão descritas no Capítulo 3, e para açúcares, no Capítulo 7. O sistema RS, descrito anteriormente, é mais útil no caso de determinadas biomoléculas.) Em contrapartida, quando um composto com um átomo de carbono assimétrico é sintetizado quimicamente em laboratório, a reação em geral produz todas as formas quirais possíveis: uma mistura das formas D e L, por exemplo. Células vivas produzem somente uma forma quiral de uma determinada biomolécula, uma vez que as enzimas que as sintetizam também são quirais.

Estereoespecificidade, a capacidade de distinguir entre estereoisômeros, é uma propriedade das enzimas e de outras proteínas e uma característica da lógica molecular das células. Se o sítio de ligação de uma proteína for complementar a um isômero do composto quiral, então ele não

será complementar ao outro isômero, da mesma forma que a luva para a mão esquerda não se ajusta à mão direita. Alguns exemplos marcantes da capacidade dos sistemas biológicos de distinguir estereoisômeros estão mostrados na **Figura 1-25**.

As classes mais comuns de reações químicas encontradas na bioquímica estão descritas no Capítulo 13, a título de introdução às reações do metabolismo.

RESUMO 1.2 Fundamentos químicos

- Devido à versatilidade das ligações que pode fazer, o carbono pode produzir um conjunto enorme de estruturas carbono-carbono com uma grande variedade de grupos funcionais; esses grupos conferem às biomoléculas as suas propriedades químicas e biológicas.
- Um conjunto universal de aproximadamente mil moléculas pequenas é encontrado nas células, sendo que a interconversão dessas moléculas nas vias metabólicas centrais se manteve conservada ao longo da evolução.
- Proteínas e ácidos nucleicos são polímeros lineares feitos de subunidades monoméricas simples; suas se-

quências contêm as informações que dão a cada molécula sua estrutura tridimensional e funções biológicas específicas.

- A configuração das moléculas pode ser alterada somente mediante quebra de ligações covalentes. Em um átomo de carbono com quatro substituintes diferentes (carbono quiral), os grupos substituintes podem estar arrançados em duas formas diferentes, gerando estereoisômeros com propriedades distintas. Somente um dos estereoisômeros é biologicamente ativo. Conformação molecular é a disposição dos átomos no espaço que pode ser mudada por rotação em torno de ligações simples, sem quebrar qualquer ligação covalente.
- Interações entre moléculas biológicas são quase invariavelmente estereoespecíficas: elas necessitam de um ajuste preciso entre as estruturas complementares das duas moléculas que reagem entre si.

1.3 Fundamentos físicos

Células e organismos vivos precisam realizar trabalho para se manterem vivos e se reproduzirem. As reações de síntese que ocorrem dentro das células, da mesma maneira que os processos de síntese em uma fábrica, exigem consumo de energia. Também é necessário gastar energia para o movimento de uma bactéria, de um velocista olímpico, para o brilho de um vaga-lume ou para a descarga elétrica de um peixe elétrico. O armazenamento e a expressão de informação necessitam de energia, sem a qual estruturas ricas em informação inevitavelmente se tornam desordenadas e sem sentido.

No curso da evolução, as células desenvolveram mecanismos altamente eficientes para aproveitar energia, obtida da luz solar ou de combustíveis químicos para usar nos processos que devem ser realizados e que dependem de energia. Um dos objetivos da bioquímica é compreender, em termos químicos e quantitativamente, os meios pelos quais a energia é extraída, armazenada e canalizada para trabalho útil nas células. As conversões de energia nas células – como todas as demais conversões de energia – podem ser estudadas no contexto das leis da termodinâmica.

Os organismos vivos existem em um estado estacionário dinâmico e nunca em equilíbrio com o meio em que se encontram

As moléculas e os íons presentes nos seres vivos diferem em tipo e concentração daqueles existentes no meio circundante. Um paramecônio em uma lagoa, um tubarão no oceano, uma bactéria no solo e uma macieira em um pomar têm composições diferentes das do meio em que se encontram e, uma vez atingida a maturidade, todos mantêm uma composição aproximadamente constante, apesar das contínuas alterações no meio.

Embora a composição característica de um organismo mude relativamente pouco ao longo do tempo, a população de moléculas dentro de um organismo está muito

distante do estado estático. Moléculas pequenas, macromoléculas e complexos supramoleculares são continuamente sintetizados e degradados em reações químicas que envolvem um fluxo constante de massa e de energia através do sistema. As moléculas de hemoglobina que carregam oxigênio dos pulmões para o cérebro em determinado momento foram sintetizadas ao longo do último mês, e no próximo mês todas elas serão degradadas e completamente substituídas por novas moléculas de hemoglobina. A glicose ingerida na última refeição agora circula na corrente sanguínea e antes do final do dia todas essas moléculas de glicose estarão convertidas em algo diferente – dióxido de carbono ou gordura, talvez – sendo substituídas por um novo suprimento de glicose, e, assim, a concentração de glicose no sangue permanece mais ou menos constante ao longo de todo o dia. As quantidades de hemoglobina e glicose no sangue permanecem quase constantes porque as taxas de síntese ou ingestão contrabalançam as taxas de degradação, consumo ou conversão em algum outro produto. Essa constância na concentração é o resultado de um *estado estacionário dinâmico*, um estado estacionário que está fora do equilíbrio. A manutenção desse estado requer investimento constante de energia; quando a célula não consegue mais obter energia, ela morre e começa a decair para um estado em equilíbrio com o seu meio. A seguir serão discutidos os significados exatos de “estado estacionário” e “equilíbrio”.

Os organismos transformam a energia e a matéria do meio

Para reações químicas que ocorrem em solução, pode-se definir **sistema** como todos os reagentes e produtos, o solvente que os contém e a atmosfera imediata – em resumo, tudo que estiver dentro de uma região definida do espaço. O sistema e o meio juntos constituem o **universo**. Se o sistema não troca nem matéria nem energia com o meio, ele é chamado de **isolado**. Se o sistema trocar energia, mas não trocar matéria com o meio, ele é **fechado**; se ele trocar energia e matéria com o meio, ele é um sistema **aberto**.

Um organismo vivo é um sistema aberto; ele troca tanto matéria quanto energia com o meio. Os seres vivos obtêm energia do meio de duas formas: (1) absorvendo combustíveis químicos (como glicose) do meio e extraindo energia pela oxidação desses combustíveis (ver Quadro 1-3, Caso 2), ou (2) absorvendo energia da luz solar.

A primeira lei da termodinâmica descreve o princípio da conversão de energia: *em qualquer mudança física ou química, a quantidade total de energia no universo permanece constante, embora a forma da energia possa mudar*. Ou seja, quando a energia é “usada” pelo sistema, ela não é “gasta”, mas convertida de uma forma em outra – por exemplo, da energia potencial das ligações químicas em energia cinética de calor e movimento. As células contêm processos sofisticados de conversão de energia, capazes de converter energia química, eletromagnética, mecânica e osmótica entre si com alta eficiência (**Figura 1-26**).

QUADRO 1-3 Entropia: tudo se desintegra

O termo “entropia”, que literalmente significa “mudança em seu interior”, foi usado pela primeira vez em 1851 por Rudolf Clausius, um dos formuladores da segunda lei da termodinâmica. Esse termo se refere à aleatoriedade ou à desordem dos componentes de um sistema químico. Entropia é um conceito central na bioquímica; a vida depende de continuamente manter a ordem contra a tendência da natureza de aumentar a desordem. Uma definição quantitativa rigorosa de entropia envolve considerações probabilísticas e estatísticas. Entretanto, ela pode ser ilustrada qualitativamente por três exemplos simples, cada um demonstrando um aspecto da entropia. A chave para a descrição de entropia é a *aleatoriedade* e a *desordem*, manifestadas de diferentes maneiras.

Caso 1: a chaleira e a dissipação do calor

Sabe-se que o vapor gerado pela água em ebulição pode realizar trabalho útil. Contudo, suponha-se que a chama sob a chaleira cheia de água a 100°C (“sistema”) seja apagada na cozinha (“o meio”). À medida que a água da chaleira esfria, nenhum trabalho é feito, mas o calor passa da chaleira para o meio, aumentando a temperatura do meio (cozinha) por uma quantidade infinitesimal até atingir o equilíbrio completo. Nesse momento, todas as partes da chaleira e da cozinha estão precisamente na mesma temperatura. A energia livre que antes estava concentrada na chaleira a 100°C e tinha *potencial* para realizar um trabalho desapareceu. O mesmo equivalente de energia calorífica continua presente na chaleira + cozinha (i.e., o “universo”), mas se tornou completamente aleatório.

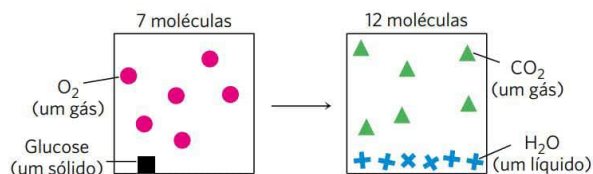
Essa energia não está mais disponível para realizar trabalho porque não existem mais diferenças de temperatura dentro da cozinha. Além disso, o aumento da entropia da cozinha (o meio) é irreversível. Sabe-se pela experiência da vida cotidiana que o calor nunca passa espontaneamente da cozinha de volta para a chaleira para aumentar novamente a temperatura da água a 100°C.

Caso 2: a oxidação da glicose

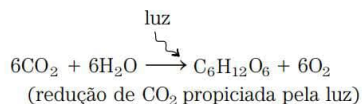
Entropia é um estado não somente da energia, mas também da matéria. Organismos aeróbicos (heterotróficos) extraem energia livre da glicose obtida do meio através da oxidação da glicose com O₂, que também é obtido do meio. Os produtos desse metabolismo oxidativo, CO₂ e H₂O, retornam ao meio. Nesse processo, o meio sofre um aumento de entropia, ao passo que o organismo permanece em estado estacionário e não sofre mudanças na sua ordem interna. Apesar de alguma entropia surgir da dissipação do calor, ela resulta também de outro tipo de desordem, ilustrado pela equação da oxidação da glicose:



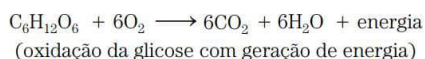
Pode-se representar isto esquematicamente como

**A energia dos organismos é fornecida por fluxo de elétrons**

Praticamente todos os organismos vivos obtêm a energia de que precisam, direta ou indiretamente, da energia radiante da luz solar. Nos organismos fotoautotróficos, a ruptura da molécula da água promovida pela luz durante a fotossíntese libera elétrons para a redução do CO₂ e a liberação de O₂ na atmosfera:



Organismos não fotossintéticos (quimiotróficos) obtêm energia pela oxidação de produtos ricos em energia armazenados em plantas e resultantes da fotossíntese, passando, então, os elétrons adquiridos ao O₂ atmosférico para formar água, CO₂ e outros produtos finais, que são reciclados no meio ambiente:



Portanto, organismos autotróficos e heterotróficos participam do ciclo global de O₂ e CO₂, propulsionado em última

instância pela luz solar e, assim, esses dois grandes grupos de organismos são interdependentes. Praticamente toda a transdução de energia nas células pode ser relacionada com esse fluxo de elétrons de uma molécula para outra, em que a energia potencial eletroquímica “escorrega” de um potencial eletroquímico mais alto para um mais baixo; de forma análoga ao fluxo de elétrons em um circuito elétrico acionado por uma pilha. Todas essas reações envolvidas no fluxo de elétrons são **reações de oxirredução**: um reagente é oxidado (perda de elétrons) enquanto outro é reduzido (ganho de elétrons).

Criar e manter ordem requer trabalho e energia

Como destacado, DNA, RNA e proteínas são macromoléculas de informação; a sequência exata das subunidades monoméricas contém informação, assim como a sequência de letras desta frase. Além de usar energia química para formar ligações covalentes entre essas subunidades, as células precisam investir energia para ordenar as subunidades nas sequências corretas. É extremamente improvável que aminoácidos em uma mistura venham a se condensar espontaneamente em um único tipo de proteína, com uma sequência única. Isso representa aumento da ordem em uma população de moléculas; porém, de acordo com a segunda lei da termodinâmica, a tendência na natureza é ir no sentido

Os átomos contidos em 1 molécula de glicose e 6 moléculas de oxigênio, um total de 7 moléculas, passam a ficar dispersos de forma mais aleatória após a reação de oxidação, passando para um total de 12 moléculas ($6 \text{ CO}_2 + 6 \text{ H}_2\text{O}$).

Sempre que uma reação química resultar em aumento no número de moléculas – ou quando uma substância sólida é convertida em produtos líquidos ou gasosos, que permitem maior liberdade de movimentação molecular que os sólidos – a desordem molecular aumenta e, em consequência, a entropia também aumenta.

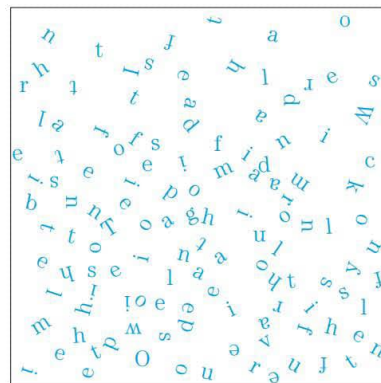
Caso 3: informação e entropia

A seguinte fala da peça de teatro *Júlio Cesar*, ato IV, Cena 3, é enunciada por Brutus, quando ele percebe que precisa enfrentar o exército de Marco Antônio. Esta frase é um arranjo não aleatório e rico em informações feito com 125 letras do alfabeto inglês:

There is a tide in the affairs of men,
Which, taken at the flood, leads on to fortune;
Omitted, all the voyage of their life
Is bound in shallows and in miseries.

Além de afirmar explicitamente, este trecho carrega muitos significados ocultos. O trecho não só reflete uma sequência complexa de eventos na peça, mas também ecoa ideias sobre conflito, ambição e os encargos exigidos pela liderança. Impregnado pelo conhecimento de Shakespeare sobre a natureza humana, ele é muito rico em informação.

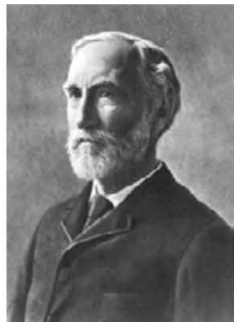
Contudo, se as 125 letras desse trecho estivessem distribuídas em um padrão completamente aleatório e caótico, como mostrado no quadro abaixo, elas não teriam significado algum.



Desse jeito, as 125 letras contêm pouca ou nenhuma informação, mas são muito ricas em entropia. Essas considerações levaram à constatação de que informação é uma forma de energia, que foi denominada “entropia negativa”. Não é à toa que o ramo da matemática denominado teoria da informação, que é básico para a programação lógica de computadores, está intimamente relacionado à teoria da termodinâmica. Os seres vivos são estruturas altamente organizadas, não aleatórias, imensamente ricas em informação e, portanto, pobres em entropia.

oposto, sempre de maior desordem no universo: *a desordem do universo aumenta continuamente*. Para sintetizar macromoléculas a partir das respectivas unidades monoméricas é preciso injetar energia livre no sistema (neste caso, a célula). A discussão da energética das reações de oxidação-redução em termos quantitativos está no Capítulo 13.

>> Convenção-chave: a aleatoriedade ou a desordem dos componentes de um sistema químico é expressa como **entropia, S** (Quadro 1-3). (Uma definição mais rigorosa da entropia está apresentada no Capítulo 13.) Qualquer alteração na aleatoriedade do sistema é expressa como variação de entropia, ΔS , que, por convenção, possui um sinal positivo quando a aleatoriedade aumenta. J. Willard Gibbs, que desenvolveu a teoria da variação de energia durante as reações químicas, demonstrou que a **energia livre total, G**, de qualquer sistema fechado pode ser definida em termos de três grandezas: **entalpia, H**, que expressa o número e os tipos de ligações; entropia, S ; e a temperatura absoluta, T (em Kelvin).



J. Willard Gibbs, 1839-1903
[Fonte: Science Source.]

A definição de energia livre é $G = H - TS$. Quando uma reação química ocorre com a temperatura constante, a **variação da energia livre ΔG** , é determinada pela variação da entalpia, ΔH , refletindo o tipo e o número das ligações químicas e a formação e a quebra de interações não covalentes, e a variação da entropia, ΔS , que descreve a variação da aleatoriedade do sistema:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

em que, por definição, ΔH é negativo para uma reação que libera calor (reação exotérmica), ΔS é positivo para uma reação que aumenta a aleatoriedade do sistema (diminui a ordem). <<

Um processo tende a ocorrer espontaneamente somente se ΔG for negativo (se energia livre é liberada no processo). Já o funcionamento das células depende basicamente de moléculas, como proteínas e ácidos nucleicos, para as quais a energia livre de formação é positiva: as moléculas são menos estáveis e mais altamente ordenadas do que a mistura de seus componentes monoméricos. Para que essas reações consumidoras de energia (**endergônicas**) e, portanto, termodinamicamente desfavoráveis, ocorram, as células acoplam-nas a reações que liberam energia (**exergônicas**), de forma que o processo como um todo é exergônico: a soma da variação da energia livre é negativa.

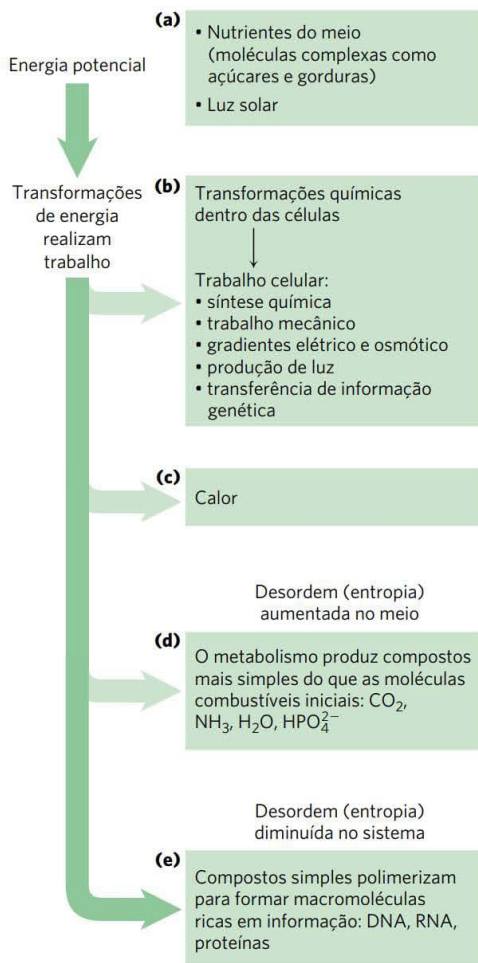
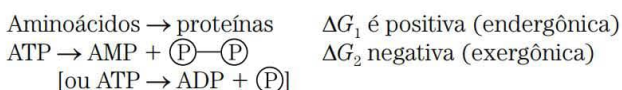


FIGURA 1-26 Algumas interconversões de energia em organismos vivos. À medida que a energia metabólica é gasta para realizar o trabalho celular, o grau de desordem do sistema “mais” o do meio externo (expresso quantitativamente como entropia) cresce à medida que a energia potencial das moléculas nutrientes complexas decresce. **(a)** Os seres vivos extraem energia dos arredores; **(b)** convertem parte dela em formas úteis de energia para produzir trabalho; **(c)** devolvem parte dela aos arredores na forma de calor; e **(d)** liberam moléculas como produto final que são menos organizadas que os combustíveis iniciais, aumentando a entropia do universo. Um dos efeitos dessas transformações é **(e)** o aumento da ordem (diminui a aleatoriedade) do sistema na forma de macromoléculas complexas. O tratamento quantitativo da entropia será retomado no Capítulo 13.

A fonte costumeira de energia livre em reações biológicas acopladas é a energia liberada pela quebra de ligações fosfoanidrido, como aquelas presentes no trifosfato de adenosina (ATP; **Figura 1-27**) e no trifosfato de guanosina (GTP). Aqui, cada P representa um grupo fosforila:



Quando essas reações estão acopladas a soma de ΔG_1 com ΔG_2 é negativa e o processo como um todo é exergônico. Por meio dessa estratégia de acoplamento, as células con-

seguem sintetizar e manter polímeros ricos em informação essenciais para a vida.

Reações de acoplamento de energia nos sistemas biológicos

A questão central da *bioenergética* (estudo da transformação de energia em sistemas vivos) é a maneira pela qual a energia do metabolismo dos combustíveis ou da captura de luz é acoplada às reações que requerem energia. Ao pensar em acoplamento energético, é útil considerar um exemplo mecânico simples, como mostra a **Figura 1-28a**. Um objeto no topo de um plano inclinado tem certa quantidade de energia potencial em decorrência da sua elevação. Ele tende a deslizar para baixo ao longo do plano, perdendo a sua energia potencial de posição à medida que se aproxima do solo. Quando um mecanismo com corda de puxar apropriado acopla o objeto em queda a outro, menor, o movimento de deslize espontâneo do maior pode levantar o menor, realizando certa quantidade de trabalho. A quantidade de energia disponível para realizar trabalho é a **variação de energia livre**, ΔG , sendo sempre um pouco menor do que a quantidade teórica de energia liberada, uma vez que um pouco de energia é dissipada como calor decorrente do atrito. Quanto maior a elevação e maior for o objeto, maior será a energia liberada (ΔG) com o deslize e maior a quantidade de trabalho que poderá ser realizado. Um objeto grande pode levantar um menor somente porque, no início, o objeto grande estava *longe da sua posição de equilíbrio*: ele foi, em algum momento

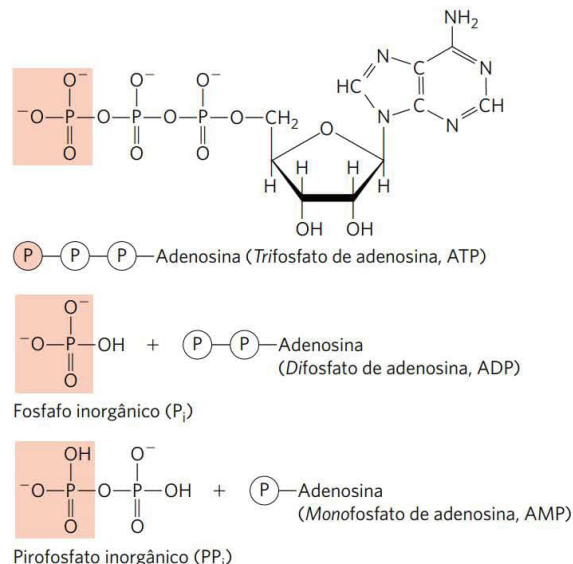
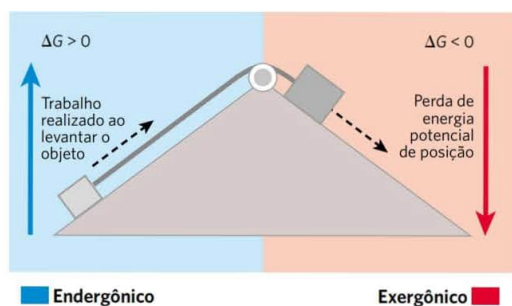


FIGURA 1-27 O trifosfato de adenosina (ATP) fornece energia.

Aqui, cada P representa um grupo fosforila: a remoção do grupo fosforila terminal (marcado em vermelho) do ATP, pela quebra da ligação fosfoanidrido para gerar difosfato de adenosina (ADP) e o íon fosfato inorgânico (HPO_4^{2-}), é altamente exergônica; essa reação costuma ser acoplada a várias reações endergônicas nas células (como no exemplo da **Figura 1-28b**). O ATP também fornece energia para vários processos celulares pela clivagem que libera os dois fosfatos terminais, resultando em pirofosfato inorgânico ($\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7^{2-}$), frequentemente abreviado como PP_i .

(a) Exemplo mecânico



(b) Exemplo químico

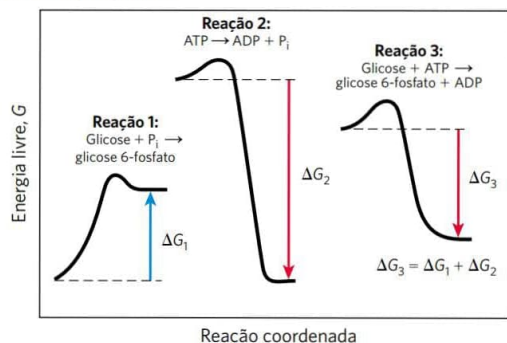


FIGURA 1-28 Acoplamento energético em processos químicos e mecânicos.

(a) O movimento da queda de um objeto libera energia potencial que pode realizar trabalho mecânico. A energia potencial disponibilizada pelo movimento de queda espontânea, no processo exergônico (em vermelho), pode ser acoplada ao processo endoergônico representado pelo movimento ascendente de um segundo objeto (em azul). (b) Na reação 1, a formação de glicose-6-fosfato a partir da glicose e do fosfato inorgânico (P_i) gera um produto com conteúdo energético maior que o dos reagentes. Para esta reação endoergônica, ΔG é positivo. Na reação 2, a quebra exergônica do trifosfato de adenosina (ATP) tem uma grande variação negativa de energia livre (ΔG_2). A terceira reação é a soma das reações 1 e 2, e a variação da energia livre, ΔG_3 , é a soma aritmética de ΔG_1 e ΔG_2 . Pelo fato de ΔG_3 ser negativo, o processo como um todo é exergônico e ocorre espontaneamente.

anterior, elevado acima do solo, processo que precisou de entrada de energia.

Como isso se aplica às reações químicas? Em sistemas fechados, as reações químicas ocorrem espontaneamente até chegar ao **equilíbrio**. Quando um sistema está em equilíbrio, a velocidade de formação de produtos se iguala exatamente à velocidade na qual os produtos são convertidos em reagentes. Portanto, não existe variação líquida na concentração de reagentes e produtos. Quando um sistema muda do estado inicial ao estado de equilíbrio, a variação de energia é dada pela variação de energia livre, ΔG , desde que não ocorra variação de temperatura ou de pressão. A magnitude de ΔG depende da reação química em questão e o quanto longe do equilíbrio o sistema estava inicialmente. Cada composto envolvido em uma reação química contém certa quantidade de energia potencial. Essa energia está relacionada com o tipo e o número das ligações. Nas reações que ocorrem espontaneamente, os produtos têm menos energia livre que os reagentes, portanto, a reação libera energia livre,

que, por sua vez, fica disponível para realizar trabalho. Essas reações são exergônicas (ou exotérmicas); a diminuição na energia livre dos reagentes em relação aos produtos é expressa como um valor negativo. Reações endergônicas (ou endotérmicas) precisam de um fornecimento de energia, e os valores de ΔG são positivos. Assim como no processo mecânico, somente parte da energia liberada na reação química exergônica pode ser utilizada para realizar trabalho. Em sistemas vivos, parte da energia é dissipada como calor ou perdida como incremento de entropia.

K_{eq} e ΔG° são medidas de a tendência das reações ocorrerem espontaneamente

A tendência de uma reação química de se completar pode ser expressa pela constante de equilíbrio. Para uma reação na qual uma quantidade de a mols de A reagem com b mols de B para dar c mols de C e d mols de D,



a constante de equilíbrio, K_{eq} , é dada por

$$K_{eq} = \frac{[C]_{eq}^c [D]_{eq}^d}{[A]_{eq}^a [B]_{eq}^b}$$

em que $[A]_{eq}$ é a concentração de A, $[B]_{eq}$ é a concentração de B, e assim por diante, quando o sistema chegou ao equilíbrio. K_{eq} não tem dimensão (i.e., não tem unidade de medida), mas, como está explicado na página 59, nos cálculos deste livro foi introduzido molar como unidade para ressaltar o fato de que para calcular as constantes de equilíbrio deve-se usar concentrações molares (representadas pelos colchetes). Um valor de K_{eq} grande significa que a reação tende a prosseguir até que os reagentes estejam quase completamente convertidos nos produtos.

PROBLEMA 1-1 ATP e ADP estão em equilíbrio nas células?

A constante de equilíbrio, K_{eq} , para a reação seguinte é 2×10^5 M:



Caso as concentrações que forem medidas dentro das células sejam: $[ATP] = 5$ mM, $[ADP] = 0,5$ mM e $[P_i] = 5$ mM esta reação estará em equilíbrio na célula?

Solução: a definição da constante de equilíbrio para esta reação é:

$$K_{eq} = [ADP][P_i]/[ATP]$$

Das concentrações celulares medidas e dadas acima, pode-se calcular a razão da ação das massas, Q :

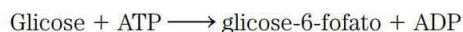
$$Q = [ADP][P_i]/[ATP] = (0,5 \text{ mM})(5 \text{ mM})/5 \text{ mM} = 0,5 \text{ mM} = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$$

Este valor está longe da constante de equilíbrio para a reação (2×10^5 M), portanto, nas células, essa reação está

muito longe do equilíbrio. [ATP] está muito alta e [ADP] muito abaixo do esperado para a condição de equilíbrio. Como uma célula pode manter uma relação [ATP]/[ADP] tão longe do equilíbrio? A célula faz isso mediante a contínua extração de energia (de nutrientes como glicose) e utiliza essa energia para fazer ATP a partir de ADP e P_i .

PROBLEMA 1-2 A reação da hexocinase está em equilíbrio nas células?

Para a reação catalisada pela enzima hexocinase, tem-se:



a constante de equilíbrio, K_{eq} , é $7,8 \times 10^2$. Em células de *E. coli* vivas, [ATP] = 5 mM, [ADP] = 0,5 mM, [glicose] = 2 mM e [glicose-6-fosfato] = 1 mM. Na *E. coli*, a reação está em equilíbrio?

Solução: no equilíbrio,

$$K_{eq} = 7,8 \times 10^2 = \frac{[\text{ADP}][\text{glicose-6-fosfato}]}{[\text{ATP}][\text{glicose}]}$$

Em células vivas, $\frac{[\text{ADP}][\text{glicose-6-fosfato}]}{[\text{ATP}][\text{glicose}]} = \frac{(0,5 \text{ mM})(1 \text{ mM})}{(5 \text{ mM})(2 \text{ mM})} = 0,05$. A reação está, portanto, *longe* do equilíbrio: a concentração celular dos produtos (glicose-6-fosfato e ADP) está muito mais baixa que o esperado no equilíbrio, e a dos reagentes, muito mais alta. Logo, a reação tende fortemente a se deslocar para a direita.

Gibbs mostrou que ΔG (a variação da energia livre) para qualquer reação química é uma função da **variação da energia livre padrão, ΔG°** (constante característica de cada reação específica) e um termo que expressa a concentração inicial de reagentes e produtos:

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{[C]_i^c [D]_i^d}{[A]_i^a [B]_i^b} \quad (1-1)$$

em que $[A]_i$ é a concentração inicial de A, e assim por diante; R é a constante dos gases; e T é a temperatura absoluta.

ΔG é uma medida da distância que um sistema está em relação a sua posição de equilíbrio. Quando uma reação já alcançou o equilíbrio, não há mais nenhuma força para impulsionar a reação e já não é mais possível realizar trabalho: $\Delta G = 0$. Para este caso especial, $[A]_i = [A]_{eq}$, e assim por diante, para todos os reagentes e produtos, e

$$\frac{[C]_i^c [D]_i^d}{[A]_i^a [B]_i^b} = \frac{[C]_{eq}^c [D]_{eq}^d}{[A]_{eq}^a [B]_{eq}^b}$$

Substituindo 0 na Equação 1-1 por ΔG e K_{eq} por $\frac{[C]_i^c [D]_i^d}{[A]_i^a [B]_i^b}$, obtém-se a relação

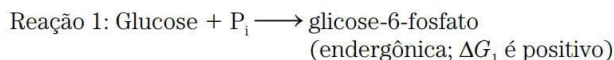
$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_{eq}$$

da qual pode-se ver que ΔG° é simplesmente uma segunda maneira, além de K_{eq} , de expressar a força que impulsiona uma reação. Como é possível medir K_{eq} , pode-se determinar ΔG° , que é uma constante termodinâmica característica de cada reação.

As unidades de ΔG° e ΔG são joules por mol (ou calorias por mol). Quando $K_{eq} \gg 1$, ΔG° é grande e negativo, e quando $K_{eq} \ll 1$, ΔG° é grande e positivo. A partir de uma tabela de valores de K_{eq} e de ΔG° determinados experimentalmente pode-se ver logo a primeira vista quais reações tendem a se completar e quais não.

Um cuidado deve ser tomado a respeito da interpretação de ΔG° : constantes *termodinâmicas* como estas indicam onde o equilíbrio final de uma reação se encontra, mas não com que rapidez esse equilíbrio foi alcançado. As velocidades das reações são governadas por parâmetros *cinéticos*, tópico que será considerado em detalhes no Capítulo 6.

Nos seres vivos, como no exemplo matemático da Figura 1-28a, uma reação exergônica pode ser acoplada a uma reação endergônica para empurrar reações que, não fosse esse acoplamento, seriam desfavoráveis. A Figura 1-27b (tipo de gráfico chamado de diagrama de coordenada da reação) ilustra esse princípio para a conversão de glicose em glicose-6-fosfato, o primeiro passo da rota da oxidação da glicose. A forma mais simples de produzir glicose-6-fosfato seria:



(A estrutura desses compostos não é relevante agora, pois elas serão descritas em detalhes mais adiante.) Essa reação não ocorre espontaneamente, pois ΔG_1 é positivo. Uma segunda reação, extremamente exergônica pode ocorrer em todas as células:



Essas duas reações químicas compartilham um intermediário comum, P_i , o qual é consumido na reação 1 e produzido na reação 2. Portanto, as duas reações podem ser acopladas na forma de uma terceira reação, que pode ser escrita como a soma das reações 1 e 2, com o intermediário comum, P_i , omitido de ambos os lados da equação:

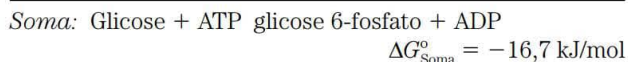
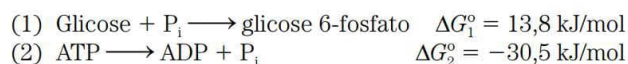


Pelo fato de mais energia ser liberada na reação 2 do que consumida na reação 1, a energia livre para a reação 3, ΔG_3 , é negativa, e a síntese de glicose-6-fosfato pode consequentemente ocorrer na reação 3.

PROBLEMA 1-3 As variações de energia livre padrão são aditivas

Dado que a variação da energia padrão para a reação glicose + $P_i \longrightarrow$ glicose-6-fosfato é 13,8 kJ/mol e que a variação da energia livre padrão da reação $\text{ATP} \longrightarrow \text{ADP} + P_i$ é -30,5 kJ/mol, qual é a variação da energia livre para a reação glicose + ATP \longrightarrow glicose-6-fosfato + ADP?

Solução: é possível escrever a equação para esta reação como a soma de duas outras reações:

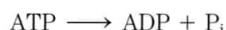


A variação da energia livre padrão de duas reações que se somam resultando em uma terceira é simplesmente a soma da variação da energia de cada uma das reações individuais. O valor negativo de ΔG° ($-16,7$ kJ/mol) indica que essa reação ocorre espontaneamente.

O acoplamento de reações exergônicas com endergônicas por meio de um intermediário comum é o ponto central nas trocas de energia nos sistemas vivos. Como será visto, reações que quebram ATP (como a reação 2 da Figura 1-27b) liberam energia que impele muitos processos endergônicos nas células. A quebra de ATP nas células é exergônica porque *todos os seres vivos mantêm a concentração de ATP bem acima da sua concentração de equilíbrio*. É este desequilíbrio que permite ao ATP servir como principal carreador de energia nas células. Como será visto em mais detalhes no Capítulo 13, não é a mera quebra de ATP que fornece energia para realizar as reações endergônicas; em vez disso, é a *transferência do grupo fosforila* do ATP para outra molécula pequena (glicose no caso acima) que conserva parte da energia potencial original no ATP.

PROBLEMA 1-4 O custo energético da síntese de ATP

Se a constante de equilíbrio, K_{eq} , para essa reação



for $2,22 \times 10^5$ M, calcule a variação da energia livre padrão, ΔG° , para a *síntese* de ATP a partir de ADP e P_i a 25°C .

Solução: primeiro deve-se calcular ΔG° para a reação acima.

$$\begin{aligned}\Delta G^\circ &= -RT \ln K_{eq} \\ &= -(8,315 \text{ J/mol} \cdot \text{K}) (298 \text{ K}) (\ln 2,22 \times 10^5) \\ &= -30,5 \text{ kJ/mol}\end{aligned}$$

Essa é a variação da energia livre padrão para a *quebra* de ATP em ADP e P_i . A variação da energia livre padrão para a reação *inversa* tem o mesmo valor absoluto, mas de sinal contrário. A variação da energia livre padrão para o inverso da reação apresentada é, portanto, $30,5$ kJ/mol. Então, para sintetizar 1 mol de ATP sob condições normais (25°C , concentração 1 M de ATP, ADP e P_i), deve ser fornecido um mínimo de $30,5$ kJ de energia. De fato, a variação de energia livre nas células – aproximadamente 50 kJ/mol – é maior do que isso, porque as concentrações de ATP, ADP e P_i nas células não são o padrão 1 M (ver Problema Resolvido 13-2, p. 509).

PROBLEMA 1-5 Variação da energia livre padrão para a síntese de glicose-6-fosfato

Qual é a variação da energia livre padrão, ΔG° , sob condições fisiológicas (*E. coli* cresce no intestino humano a 37°C) para a reação seguinte?



Solução: tem-se a relação $\Delta G^\circ = -RT \ln K_{eq}$ e o valor de K_{eq} para esta reação, $7,8 \times 10^2$. Substituindo-se os valores de R , T e K_{eq} na equação resulta:

$$\begin{aligned}\Delta G^\circ &= -(8,315 \text{ J/mol} \cdot \text{K}) (310 \text{ K}) (\ln 7,8 \times 10^2) \\ &= -17 \text{ kJ/mol}\end{aligned}$$

Observe que esse valor é levemente diferente daquele do Problema Resolvido 1-3. No cálculo anterior, se supôs uma temperatura de 25°C (298 K), ao passo que agora foi utilizada a temperatura fisiológica de 37°C (310 K).

Enzimas determinam seqüências de reações químicas

Todas as macromoléculas biológicas são muito menos estáveis termodinamicamente se comparadas com suas unidades monoméricas, mas ainda assim são *cineticamente estáveis*: suas quebras *não catalisadas* ocorrem tão lentamente (ao longo de anos, em vez de segundos) que, em uma escala de tempo típica dos seres vivos, essas moléculas podem ser consideradas estáveis. Praticamente todas as reações químicas das células ocorrem a velocidades significativas somente na presença de **enzimas** – biocatalisadores que, como todos os outros catalisadores, aumentam bastante a velocidade de reações químicas específicas sem, contudo, serem consumidos no processo.

O caminho de reagente(s) a produto(s) invariavelmente envolve uma barreira energética, chamada de potencial de ativação (**Figura 1-29**), que precisa ser superada para que uma reação possa ocorrer. A quebra de ligações existentes e a formação de novas ligações geralmente requer, em primeiro lugar, a modificação das ligações existentes para criar um **estado de transição** que tem energia livre maior que a dos

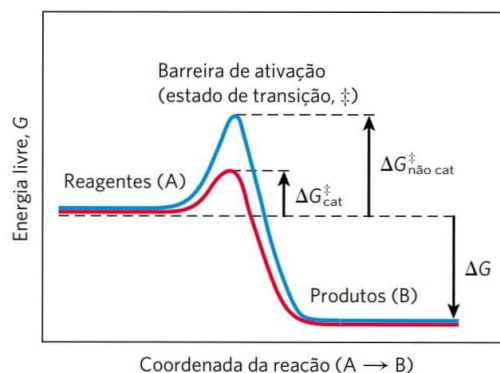


FIGURA 1-29 Mudanças de energia durante uma reação química.

Uma barreira de potencial, também chamada de barreira de ativação, representando o estado de transição (ver Capítulo 6), precisa ser superada na conversão dos reagentes (A) nos produtos (B), mesmo que os produtos sejam mais estáveis do que os reagentes, como uma variação grande e negativa da energia livre (ΔG) indica. A energia necessária para transpor a barreira de potencial é chamada de energia de ativação (ΔG^\ddagger). As enzimas catalisam as reações diminuindo a barreira do potencial de ativação. Elas ligam-se fortemente aos intermediários dos estados de transição e a energia de ligação desta interação efetivamente reduz a energia de ativação de $\Delta G^\ddagger_{\text{não cat}}$ (curva azul) para $\Delta G^\ddagger_{\text{cat}}$ (curva vermelha). (Observe que a energia de ativação não está relacionada à variação da energia livre, ΔG .)

reagentes ou dos produtos. O ponto mais alto no diagrama da coordenada de reação representa o estado de transição, e a diferença de energia entre o reagente no seu estado fundamental e em seu estado de transição consiste na **energia de ativação, ΔG^\ddagger** . Uma enzima catalisa a reação ao proporcionar uma acomodação mais confortável ao estado de transição: uma superfície que complementa o estado de transição em sua estereoquímica, polaridade e carga. A ligação da enzima ao estado de transição é exergônica, e a energia liberada por essa ligação reduz a energia de ativação para a reação, aumentando muito, por consequência, a velocidade da reação.

Uma contribuição adicional à catálise ocorre quando dois ou mais reagentes se ligam na superfície da enzima próximos um do outro e em uma orientação estereoespecífica que favorece a reação. Isso aumenta em várias ordens de grandeza a probabilidade de haver colisões produtivas entre os reagentes. Como resultado desses fatores, e ainda com outros (discutidos no Capítulo 6), as reações catalisadas por enzimas normalmente ocorrem a velocidades 10^{12} vezes mais rápidas do que as reações não catalisadas. (Isso é um *trilhão* de vezes mais rápido!)

Os catalisadores das células são, com algumas raras exceções, proteínas. (Algumas moléculas de RNA têm atividade enzimática, como está discutido nos Capítulos 26 e 27.) Novamente, com algumas exceções, cada enzima catalisa uma reação específica e cada reação no interior da célula é catalisada por uma enzima diferente. Portanto, cada célula tem necessidade de milhares de enzimas diferentes. A multiplicidade de enzimas, suas especificidades (capacidade de diferenciar os reagentes uns dos outros) e suas possibilidades de regulação dão às células a capacidade de diminuir seletivamente as barreiras dos potenciais de ativação. Essa seletividade é crucial para a regulação efetiva dos processos celulares. Ao permitir que reações específicas ocorram a velocidades significativas em momentos específicos, as enzimas determinam como a matéria e a energia são canalizadas nas atividades celulares.

As milhares de reações químicas catalisadas por enzimas que ocorrem nas células são organizadas funcionalmente em muitas sequências de reações consecutivas, chamadas de **vias**, nas quais o produto de uma reação se torna o reagente da seguinte. Algumas vias degradam nutrientes orgânicos em produtos finais simples e, assim, podem extrair energia química e convertê-la em formas úteis à célula. O conjunto dessas reações degradativas e produtoras de energia livre é designado **catabolismo**. A energia liberada pelas reações catabólicas impulsiona a síntese de ATP. Como resultado, a concentração celular de ATP está bem acima da sua concentração de equilíbrio, de modo que o ΔG para quebra de ATP é grande e negativo. De maneira similar, o catabolismo leva à produção de carreadores de elétrons reduzidos, NADH e NADPH, e ambos podem doar elétrons em processos que geram ATP ou realizar etapas redutoras em vias biossintéticas.

Outras vias iniciam com moléculas precursoras pequenas e as convertem progressivamente em moléculas maiores e mais complexas, incluindo proteínas e ácidos nucleicos. Essas vias sintéticas, que invariavelmente necessitam de

entrada de energia, são coletivamente chamadas de **anabolismo**. O conjunto de redes de vias catalisadas por enzimas, tanto as catabólicas quanto as anabólicas, constituem o **metabolismo** celular. O ATP (e os nucleosídeos trifosfatados energeticamente equivalentes, trifosfato de citidina [CTP], trifosfato de uridina [UTP] e trifosfato de guanosina [GTP]) é o elo entre os componentes catabólicos e anabólicos dessa rede (mostrada esquematicamente na **Figura 1-30**). As vias de reações catalisadas por enzimas que atuam sobre os principais constituintes das células – proteínas, gorduras, açúcares e ácidos nucleicos – são praticamente idênticas em todos os seres vivos.

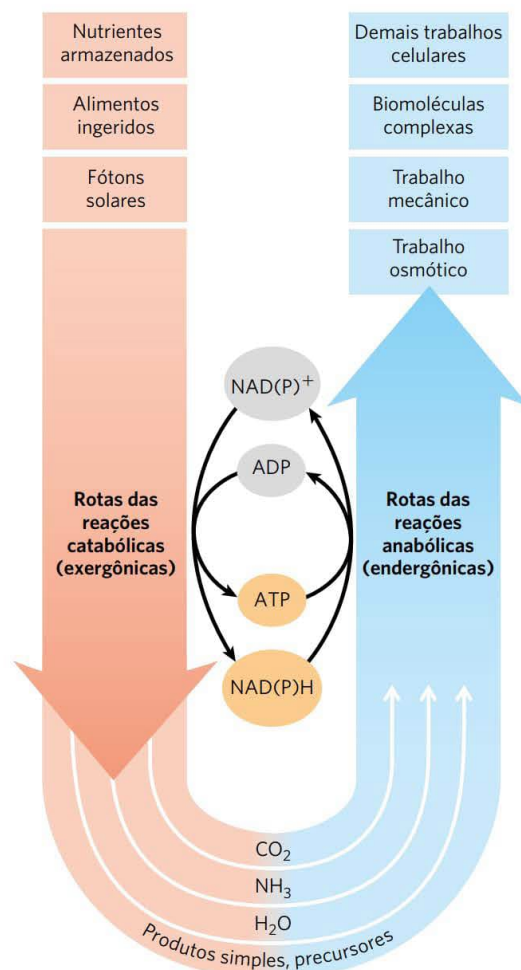
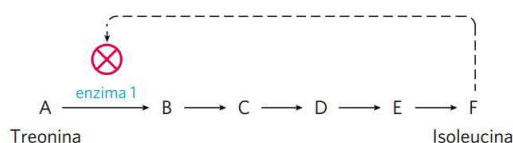


FIGURA 1-30 O papel central do ATP e do NAD(P)H no metabolismo. O ATP é o intermediário químico compartilhado que conecta os processos celulares que liberam energia com os que consomem energia. Seu papel na célula é análogo ao do dinheiro na economia: ele é “produzido/adquirido” nas reações exergônicas e “gasto/consumido” nas reações anabólicas. O NAD(P)H (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo [fosfato]) é um cofator carreador de elétrons que capta elétrons de reações oxidativas e então os doa, em uma ampla gama de reações de redução na biossíntese. Esses cofatores essenciais às reações anabólicas, presentes em concentrações relativamente baixas, precisam ser constantemente regenerados pelas reações catabólicas.

O metabolismo é regulado para alcançar um equilíbrio e ser econômico

As células não só sintetizam simultaneamente milhares de tipos diferentes de carboidratos, gorduras, proteínas e moléculas de ácidos nucleicos e suas subunidades mais simples, como o fazem nas quantidades e proporções exatas de que a célula precisa em determinada circunstância. Por exemplo, os precursores de proteínas e ácidos nucleicos devem ser produzidos em grandes quantidades durante um crescimento celular rápido. Por outro lado, em células que não estão crescendo a demanda por esses precursores é muito menor. As enzimas-chave em cada via metabólica são reguladas de modo que cada tipo de molécula precursora seja produzido na quantidade apropriada às demandas momentâneas das células.

Considere, por exemplo, a via que leva à síntese do aminoácido isoleucina, um constituinte das proteínas, em *E. coli*. A via tem cinco passos catalisados por cinco enzimas diferentes (A a F representam os intermediários da via):



Se uma célula começa a produzir mais isoleucina do que o necessário para a síntese de proteínas, então a isoleucina não usada se acumula, e o acréscimo em sua concentração inibe a atividade catalítica da primeira enzima da via, causando a imediata desaceleração da produção de isoleucina. Esta **inibição por retroalimentação** mantém o equilíbrio entre a produção e a utilização de cada intermediário (ao longo do livro, será usado para indicar inibição de reação enzimática).

Embora seja uma ferramenta importante para organizar o conhecimento do metabolismo, o conceito de vias independentes é muito simplificado. Existem milhares de metabólitos intermediários na célula, muitos dos quais fazem parte de mais de uma via metabólica. O metabolismo estaria melhor representado por uma rede de vias interconectadas e interdependentes. Qualquer mudança na concentração de qualquer metabólito dá início a um efeito de busca de equilíbrio que afeta o fluxo de materiais pelas outras vias. A tarefa de entender as interações complexas entre intermediários e vias em termos quantitativos é desencorajadora, mas a abordagem propiciada pela **biologia de sistemas**, discutida no Capítulo 15, começou a dar elementos para compreender melhor a regulação global do metabolismo.

As células regulam também a síntese de seus próprios catalisadores, as enzimas, em resposta ao aumento ou à diminuição da necessidade de um produto metabólico; esse é o assunto do Capítulo 28. A regulação da expressão de genes (a tradução da informação contida no DNA em proteínas ativas na célula) e a síntese de enzimas são outros níveis de controle metabólico na célula. Todos os níveis devem ser levados em consideração para descrever o controle global do metabolismo celular.

RESUMO 1.3 Fundamentos físicos

- Células são sistemas abertos que trocam matéria e energia com o meio externo, extraindo e canalizando energia para se manterem em um estado estacionário dinâmico longe do equilíbrio. A energia é obtida do sol ou de combustíveis químicos por meio da conversão da energia proveniente do fluxo de elétrons em ligações químicas na molécula de ATP.
- A tendência de uma reação química de prosseguir em direção ao equilíbrio pode ser expressa como função da energia livre, ΔG , que tem dois componentes: a variação da entalpia, ΔH , e a variação da entropia, ΔS . Essas variáveis estão relacionadas por meio da equação $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$.
- Quando o ΔG de uma reação for negativo, a reação é exergônica e tende a seguir para sua conclusão; quando o ΔG for positivo, a reação é endergônica e tende a ir na direção oposta. Quando duas reações podem ser somadas para produzir uma terceira, o ΔG da reação global é a soma dos ΔG das duas reações separadas.
- As reações que convertem ATP em P_i e ADP ou em AMP e PP_i são altamente exergônicas (ΔG negativo e grande em módulo). Muitas reações celulares endergônicas são propulsionadas pelo acoplamento, mediante um intermediário comum, com reações altamente exergônicas.
- A variação da energia livre padrão, ΔG° , é uma constante física relacionada à constante de equilíbrio pela equação $\Delta G^\circ = -RT \ln K_{eq}$.
- Quase todas as reações das células ocorrem a velocidades apropriadas somente porque as enzimas estão presentes para catalisá-las. As enzimas atuam em parte pela estabilização do estado de transição, reduzindo a energia de ativação, ΔG^\ddagger , e aumentando a velocidade de reação em várias ordens de grandeza. A atividade catalítica das enzimas nas células é regulada.
- Metabolismo é o somatório das muitas sequências de reações interconectadas, nas quais as células convertem metabólitos uns nos outros. Cada sequência é regulada para suprir aquilo que a célula precisa em um dado momento e para gastar energia somente quando necessário.

1.4 Fundamentos genéticos

Talvez a propriedade mais extraordinária dos organismos e das células seja a capacidade de se reproduzir por incontáveis gerações mantendo uma fidelidade quase perfeita. Essa continuidade das características herdadas sugere uma constância, ao longo de milhões de anos, na estrutura das moléculas que contêm a informação genética. Poucos registros históricos de civilizações sobreviveram por mil anos mesmo quando riscados em superfícies de cobre ou talhados em pedra (**Figura 1-31**). Contudo, existem boas evidências de que as instruções genéticas permaneceram praticamente intactas nos seres vivos por períodos muito maiores. Muitas bactérias têm praticamente o mesmo tamanho, forma e

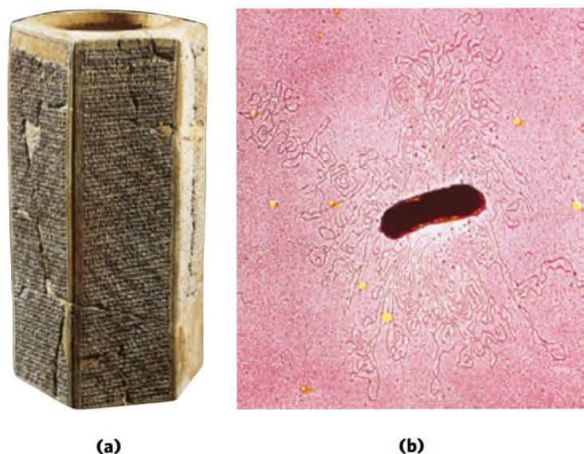


FIGURA 1-31 Duas inscrições antigas. **(a)** O Obelisco de Senaqueribe, inscrito em torno de 700 a.C., descreve com caracteres da linguagem assíria alguns eventos históricos durante o reinado do Rei Senaqueribe. O obelisco contém cerca de 20 mil caracteres, pesa cerca de 50 kg e sobreviveu de forma quase intacta por 2.700 anos. **(b)** Uma única molécula de DNA da bactéria *E. coli*, extravasada de uma célula rompida, é centenas de vezes mais comprida do que a própria célula e contém codificada toda a informação necessária para especificar a estrutura e as funções da célula. O DNA bacteriano contém cerca de 4,6 milhões de caracteres (nucleotídeos), pesa menos do que 10^{-10} g e sofreu apenas algumas pequenas alterações durante os últimos milhões de anos (as manchas amarelas e os pontos escuros que aparecem nesta micrografia eletrônica colorida são artefatos da preparação). [Fontes: (a) Erich Lessing/Art Resource, New York. (b) Dr. Gopal Murti-CNRI/Phototake New York.]

estrutura interna, apresentando também o mesmo tipo de moléculas precursoras e enzimas das bactérias que viveram cerca de quatro bilhões de anos atrás. Essa continuidade de estrutura e de composição é o resultado da continuidade na estrutura do material genético.

A natureza química e a estrutura tridimensional do material genético, **ácido desoxirribonucleico, DNA**, estão entre as descobertas mais notáveis da biologia no século XX. A sequência de subunidades monoméricas, os nucleotídeos (estritamente, desoxirribonucleotídeos, como discutido a seguir), neste polímero linear codifica as instruções para formar todos os outros componentes celulares e serve de molde para a produção de moléculas de DNA idênticas que são distribuídas aos descendentes por ocasião da divisão celular. A perpetuação de uma espécie biológica requer que a sua informação genética seja mantida de modo estável, expressa com exatidão na forma de produtos dos genes e reproduzida com o mínimo de erros. O armazenamento, a expressão e a reprodução efetivos da mensagem genética definem cada espécie de ser vivo, distinguem uns dos outros e asseguram a continuidade de cada espécie ao longo das sucessivas gerações.

A continuidade genética está contida em uma única molécula de DNA

O DNA é um polímero orgânico, fino e longo. Essa é uma molécula rara porque em uma dimensão (a largura) têm

uma escala atômica e, na outra (comprimento), uma escala humana (uma molécula de DNA pode ter muitos centímetros de comprimento). Um espermatozoide ou um óvulo humano carrega a informação hereditária acumulada em bilhões de anos de evolução e transmite essa herança na forma de moléculas de DNA, nas quais a sequência linear de subunidades de nucleotídeos ligados covalentemente codifica a mensagem genética.

Em geral, quando são descritas as propriedades de espécies químicas é descrito o comportamento médio de um número muito grande de moléculas idênticas. Embora seja difícil prever o comportamento de uma única molécula em uma população, por exemplo, de um picomol de compostos (cerca de 6×10^{11} moléculas), o comportamento *médio* das moléculas é previsível porque o cálculo da média inclui um grande número de moléculas. O DNA celular é uma exceção notável. O DNA que forma todo o material genético da *E. coli* é uma *única molécula* contendo 4,64 milhões de pares de nucleotídeos. Essa única molécula tem de ser replicada com perfeição nos mínimos detalhes para que uma célula de *E. coli* possa gerar descendentes idênticos por divisão celular; não existe possibilidade para considerar médias nesse processo! O mesmo vale para todas as células. O espermatozoide humano traz para o óvulo que ele fertiliza somente uma molécula de DNA de cada um dos 23 cromossomos, para se combinar com somente uma molécula de cada cromossomo correspondente no óvulo. O resultado dessa união é altamente previsível: um embrião com todos os seus 20 mil genes, feitos de 3 bilhões de pares de nucleotídeos, intactos. Um feito químico impressionante!

PROBLEMA 1-6 A fidelidade da replicação do DNA

Calcule o número de vezes que o DNA de uma célula de *E. coli* que existe hoje foi copiado desde que a primeira célula bacteriana precursora surgiu há cerca de 3,5 bilhões de anos. Para simplificar, suponha-se que neste período a *E. coli* sofreu, em média, uma divisão celular a cada 12 horas (isso é superestimado para a bactéria atual, mas provavelmente subestimado para a bactéria ancestral).

Solução:

$$(1 \text{ geração}/12 \text{ h})(24 \text{ h/d})(365 \text{ d/ano})(3,5 \times 10^9 \text{ ano}) \\ = 2,6 \times 10^{12} \text{ gerações.}$$

Cada página deste livro contém cerca de 5 mil caracteres, de forma que o livro inteiro contém 5 milhões de caracteres. O cromossomo da *E. coli* também contém 5 milhões de caracteres (pares de nucleotídeos). Imagine fazer uma cópia manuscrita deste livro, passar para um colega que faz uma cópia e a passa para um terceiro colega que faz uma cópia, e assim por diante. O quanto cada uma das cópias sucessivas do livro estaria parecida com a original? Agora, imagine o texto que resultaria ao se fazer cópias de cópias à mão alguns trilhões de vezes!

FIGURA 1-32 Complementaridade entre as duas fitas de DNA.

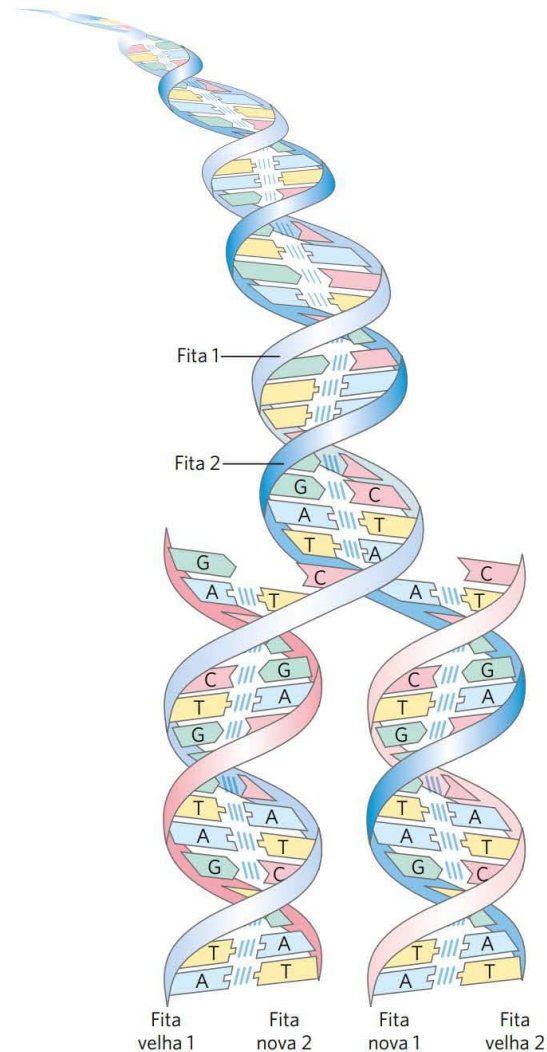
O DNA é um polímero linear de quatro tipos de desoxirribonucleotídeos, ligados covalentemente: desoxiadenilato (A), desoxiguanilato (G), desoxicitidilato (C), desoxitimidilato (T). Cada nucleotídeo, com sua estrutura tridimensional única, pode se associar especificamente, mas não covalentemente, com um nucleotídeo da cadeia complementar: A sempre se associa com T, e G, com C. Portanto, na molécula de DNA de dupla-fita, toda a sequência de nucleotídeos em uma das fitas é complementar à sequência da outra. As duas fitas, mantidas unidas por ligações de hidrogênio (representado por traços verticais em azul-claro) entre cada par de nucleotídeos complementar, enrolam-se em uma em torno da outra, formando a dupla-hélice de DNA. Na replicação do DNA, as duas fitas (em azul) separam-se e duas fitas novas (em cor-de-rosa) são sintetizadas, cada qual com uma sequência complementar às fitas originais. O resultado são duas moléculas tipo dupla-hélice e cada uma idêntica ao DNA original.

A estrutura do DNA permite sua replicação e seu reparo com uma fidelidade quase perfeita

A capacidade que os seres vivos têm de preservar seu material genético e duplicá-lo para a próxima geração deve-se a essa complementaridade entre as duas fitas da molécula de DNA (**Figura 1-32**). A unidade básica do DNA é um polímero linear de quatro subunidades monoméricas diferentes, **desoxirribonucleotídeos**, arranjados em uma sequência linear precisa. Essa sequência linear codifica a informação genética. Duas dessas fitas poliméricas estão torcidas uma em torno da outra, formando a dupla-hélice de DNA, na qual cada desoxirribonucleotídeo em uma fita paira especificamente com um desoxirribonucleotídeo complementar na fita oposta. Antes de a célula se dividir, as duas fitas de DNA se separam uma da outra e cada uma serve de molde para a síntese de uma nova fita complementar, gerando duas moléculas em forma de dupla-hélice idênticas, uma para cada célula-filha. Se qualquer uma das fitas é danificada, a continuidade da informação é assegurada pela informação presente na fita oposta, que pode atuar como molde para reparar o dano.

A sequência linear no DNA codifica proteínas com estrutura tridimensional

A informação no DNA é codificada na sequência linear (unidimensional) de subunidades de desoxirribonucleotídeos, mas a expressão dessa informação resulta em uma célula tridimensional. Essa transformação da informação de uma dimensão para três dimensões ocorre em duas fases. Uma sequência linear de desoxirribonucleotídeos no DNA codifica (por meio de um intermediário, RNA) a produção de uma proteína com uma sequência linear de aminoácidos correspondente à sequência do DNA (**Figura 1-33**). A proteína é enovelada em uma forma tridimensional específica determinada pela sequência de aminoácidos e estabilizada principalmente por interações não covalentes. Embora a forma final da proteína enovelada seja ditada pela sua sequência de aminoácidos, o processo de enovelamento é ajudado por “chaperonas moleculares” (ver Figura 4-30). A estrutura tridimensional precisa, ou **conformação nativa**, de uma proteína é crucial para sua função.



Uma vez em sua conformação nativa, a proteína pode associar-se não covalentemente com outras macromoléculas (outras proteínas, ácidos nucleicos ou lipídeos) para formar complexos supramoleculares, como cromossomos, ribossomos ou membranas. As moléculas individuais desses complexos têm sítios de ligação específicos com alta afinidade para outras moléculas e elas se agrupam espontaneamente dentro das células, formando complexos funcionais.

Embora as sequências de aminoácidos das proteínas carreguem toda a informação necessária para chegar até a conformação nativa da proteína, o enovelamento preciso e a automontagem também necessitam do ambiente celular adequado – pH, força iônica, concentrações de íons metálicos, e assim por diante. Portanto, a sequência de DNA sozinha não é suficiente para formar e manter uma célula completamente funcional.

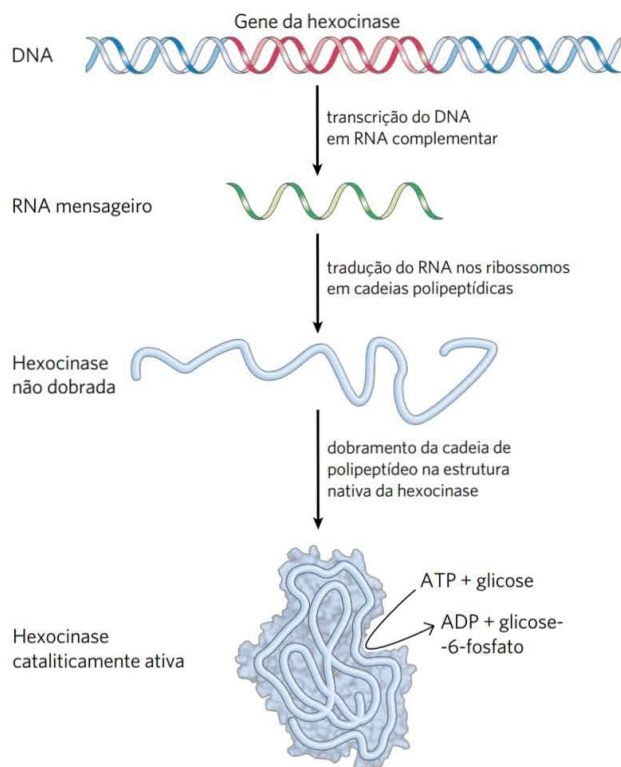


FIGURA 1-33 Do DNA ao RNA, do RNA à proteína e da proteína à enzima (hexocinase). A sequência linear de desoxirribonucleotídeos no DNA (o gene) que codifica a proteína hexocinase é primeiro transcrita em uma molécula de ácido ribonucleico (RNA) com uma sequência complementar de ribonucleotídeos. A sequência do RNA (RNA mensageiro) é, então, traduzida na cadeia linear da proteína hexocinase, que se dobra na forma nativa tridimensional com o auxílio das chaperonas moleculares. Atingida a forma nativa, a hexocinase passa a ter atividade catalítica: ela catalisa a fosforilação da glicose, usando ATP como doador do grupo fosforila.

RESUMO 1.4 Fundamentos genéticos

- A informação genética é codificada na sequência linear de quatro tipos de desoxirribonucleotídeos no DNA.
- A dupla-hélice da molécula de DNA contém um molde interno para sua própria replicação e reparo.
- Moléculas de DNA são extremamente grandes, com massas moleculares de milhões ou bilhões.
- Apesar do tamanho enorme, o DNA tem uma sequência de nucleotídeos muito precisa. A manutenção dessa sequência com toda a precisão ao longo de um período de tempo muito grande é a base da continuidade genética dos organismos.
- A sequência linear de aminoácidos em uma proteína, que está codificada no DNA do seu gene, produz a estrutura tridimensional única dessa proteína – processo que também depende das condições do ambiente.
- Macromoléculas individuais com afinidade específica por outras macromoléculas têm a capacidade de se auto-organizarem em complexos supramoleculares.

1.5 Fundamentos evolutivos

Nada na biologia faz sentido exceto sob a luz da evolução.

— Theodosius Dobzhansky, *The American Biology Teacher*, março de 1973

O grande progresso na bioquímica e na biologia molecular ocorrido nas últimas décadas confirmou a validade da contundente generalização de Dobzhansky. A notável semelhança entre as vias metabólicas e entre as sequências de genes nos três domínios da vida indica fortemente que todos os organismos modernos derivaram de um ancestral evolutivo comum por meio de uma série de pequenas mudanças (mutações), cada uma conferindo uma vantagem seletiva a algum organismo em algum nicho ecológico.

Mudanças nas instruções hereditárias possibilitam a evolução

Apesar da fidelidade quase perfeita na replicação genética, erros pouco frequentes não corrigidos (não reparados) no processo de replicação do DNA levam a mudanças na sequência de nucleotídeos do DNA, produzindo uma **mutação** genética e, assim, alterando as instruções para certo componente celular. Danos reparados incorretamente em uma das fitas do DNA provocam o mesmo efeito. Mutações no DNA passadas aos descendentes – isto é, mutações presentes nas células reprodutivas – podem ser danosas ou mesmo letais ao novo organismo ou célula; elas podem, por exemplo, ser a causa da síntese de uma enzima defeituosa incapaz de catalisar uma reação metabólica essencial. Ocasionalmente, contudo, uma mutação dá *melhores* condições para que um organismo ou uma célula sobreviva em um dado ambiente (**Figura 1-34**). Uma enzima mutante pode ter adquirido, por exemplo, uma especificidade um pouco diferente que a torna agora capaz de usar um composto que previamente a célula não tinha capacidade de metabolizar. Se uma população de células estiver em um ambiente onde aquele composto é a única ou a mais abundante fonte de combustível disponível, então a célula mutante terá vantagem competitiva sobre as células não mutadas (**tipo selvagem**) da população. A célula mutada e suas descendentes irão sobreviver e prosperar no novo ambiente, ao passo que as células do tipo selvagem irão definhar e ser eliminadas. Isso é o que Darwin denominou seleção natural – o que muitas vezes é resumido como “sobrevivência do mais adaptado”.

Ocasionalmente, uma segunda cópia de um gene inteiro é introduzida em um cromossomo como resultado da replicação defeituosa deste. A segunda cópia é desnecessária, e mutações nesse gene não serão prejudiciais, mas podem se tornar um meio pelo qual a célula possa evoluir, produzindo um novo gene com uma nova função enquanto mantém o gene original e a sua função. Sob essa óptica, as moléculas de DNA dos organismos modernos são documentos históricos, registros de uma longa jornada desde as primeiras células até os organismos modernos. Contudo, os registros históricos no DNA não estão completos. Muitas mutações devem ter sido apagadas ou reescritas ao longo da evolução. Mesmo assim, as moléculas de DNA são a melhor fonte de história biológica disponível. A frequência de erros na replicação do

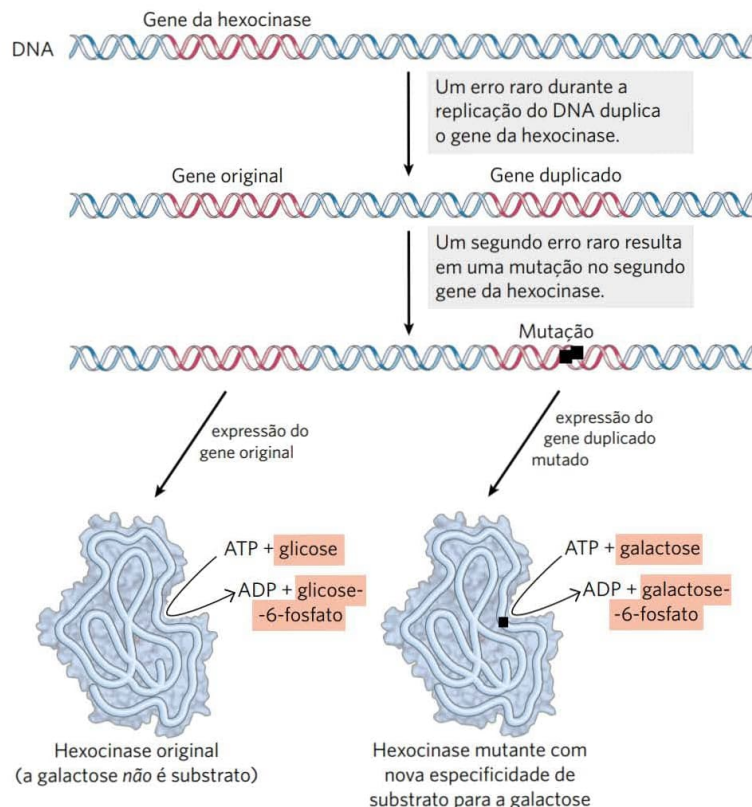


FIGURA 1-34 Duplicação e mutação de genes: um caminho para gerar novas atividades enzimáticas.

Neste exemplo, o único gene da hexocinase em um organismo hipotético pode acabar acidentalmente copiado duas vezes durante a replicação do DNA, de modo que o organismo tenha duas cópias inteiras do gene, uma delas desnecessária. Ao longo de gerações, à medida que o DNA com dois genes para a hexocinase é repetidamente replicado, alguns erros raros podem ocorrer, levando a mudanças na sequência de nucleotídeos do gene excedente e, portanto, da proteína que ele codifica. Em alguns casos raríssimos, a proteína produzida a partir desse gene mutado é alterada de forma que ela se liga a um novo substrato – galactose, neste caso hipotético. A célula contendo o gene mutante adquire uma nova capacidade (metabolizar a galactose) e isso permite que ela sobreviva em um nicho ecológico com disponibilidade de galactose e não de glicose. Se a mutação ocorrer sem a duplicação do gene, a função original do produto do gene é perdida.

DNA representa um balanço entre muitos erros (os quais gerariam células-filhas inviáveis) e relativamente poucos erros, o que impediria a variação genética que permite a sobrevivência das células mutantes em novos nichos ecológicos.

Vários bilhões de anos de seleção natural acabaram refinando os sistemas celulares para tirar o máximo das propriedades físicas e químicas das matérias-primas disponíveis. As mutações genéticas ocasionais que ocorreram em indivíduos de uma população, combinadas com a seleção natural, resultaram na evolução para essa enorme variedade de espécies de seres vivos existentes atualmente, cada uma adaptada ao seu nicho ecológico particular.

As biomoléculas surgiram primeiro na evolução química

Até aqui, foi omitido o primeiro capítulo da história da evolução: o surgimento da primeira célula viva. Os compostos orgânicos, incluindo as biomoléculas básicas, como aminoácidos e carboidratos, se não for considerada sua ocorrência nos organismos vivos, são encontrados na crosta terrestre, no mar e na atmosfera somente em quantidades ínfimas. Então como o primeiro organismo vivo conseguiu adquirir seus blocos de construção orgânicos característicos? De acordo com uma hipótese, esses compostos foram criados pelo efeito de poderosas forças ambientais – irradiação ultravioleta, relâmpagos e raios ou erupções vulcânicas – sobre os gases da atmosfera terrestre prebiótica e sobre os solutos inorgânicos em fontes hidrotermais superaquecidas nas profundezas do oceano.

Essa hipótese foi testada em um experimento clássico sobre a origem abiótica (não biológica) de biomoléculas orgânicas conduzido, em 1953, por Stanley Miller no laboratório de Harold Urey. Miller submeteu uma mistura de gases supostamente existentes na terra prebiótica, incluindo NH_3 , CH_4 , H_2O e H_2 , a uma descarga elétrica produzida por um par de eletrodos (para simular relâmpagos e raios) por um período de uma semana ou mais e, então, analisou o conteúdo do frasco da reação fechada (**Figura 1-35**). A fase gasosa da mistura continha CO e CO_2 , além dos gases presentes no material de partida. A fase líquida continha uma grande variedade de compostos orgânicos, incluindo alguns aminoácidos, ácidos orgânicos, aldeídos e ácido cianídrico (HCN). Esse experimento demonstrou que a produção abiótica de biomoléculas é possível em um tempo relativamente curto e em condições relativamente brandas. Quando as amostras de Miller cuidadosamente guardadas foram redescobertas em 2010 e examinadas com técnicas de muita sensibilidade e alto poder de resolução (cromatografia líquida de alto desempenho e espectrometria de massas), as suas observações originais foram confirmadas e ampliadas significativamente. Resultados previamente não publicados por Miller e que incluíam H_2S na mistura gasosa (imitando as condições das atividades vulcânicas no fundo do mar; **Figura 1-36**) mostraram a formação de 23 aminoácidos e 7 compostos organossulfurados, bem como um grande número de outros compostos simples que podem ter servido como blocos de construção da evolução prebiótica.

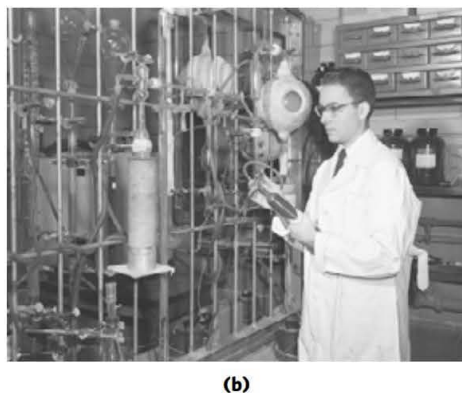
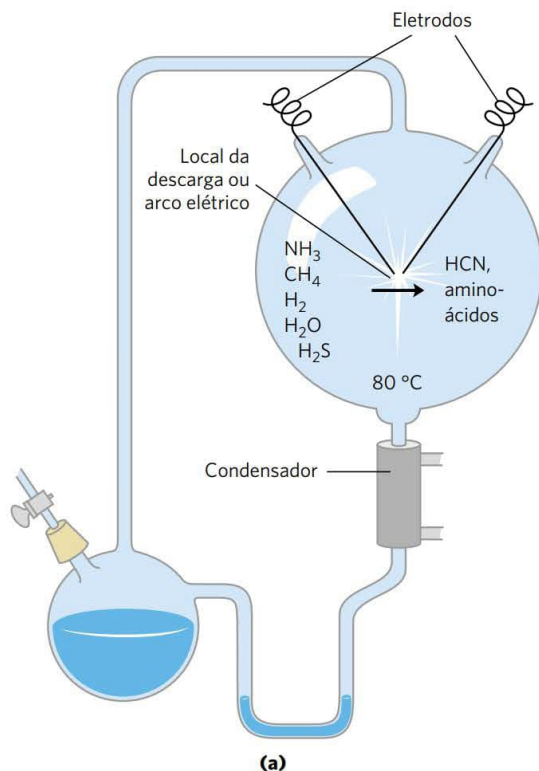


FIGURA 1-35 Produção abiótica de biomoléculas. (a) Aparelho de descargas elétricas usado por Miller e Urey em experimentos, demonstrando a formação abiótica de compostos orgânicos em condições atmosféricas primitivas. Após submeter a mistura gasosa do sistema a descargas elétricas, os produtos formados foram coletados por condensação. Biomoléculas como aminoácidos estavam entre esses produtos. (b) Stanley L. Miller (1930-2007) usando seu aparelho de descargas elétricas. [Fonte: (b) Bettmann/Corbis.]

Experimentos de laboratório mais refinados forneceram boas evidências de que muitos dos componentes químicos das células, incluindo polipeptídeos e moléculas parecidas com o RNA, podem se formar sob essas condições. Polímeros de RNA podem atuar como catalisadores em reações biologicamente importantes (ver Capítulos 26 e 27). O RNA provavelmente exerceu um papel crucial na evolução prebiótica, tanto como catalisador como também como repositório

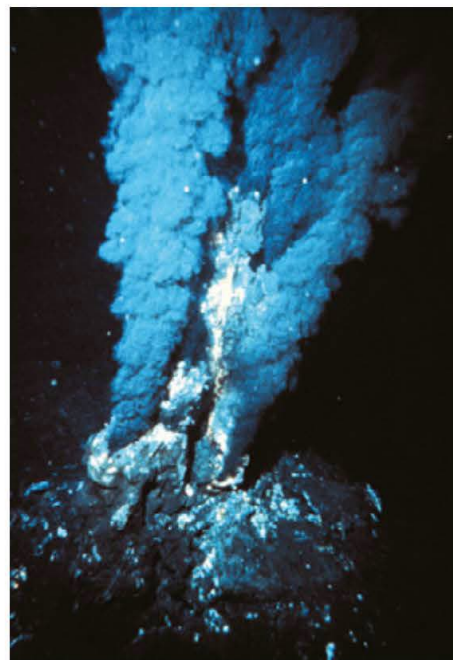


FIGURA 1-36 Colunas quentes contendo material escuro. Fontes hidrotermais no leito do oceano emitem água superaquecida e rica em minerais dissolvidos. Uma coluna escura é formada quando o jato superaquecido encontra a água fria do oceano, causando a precipitação dos sulfatos dissolvidos. Diversas formas de vida, incluindo arqueias e alguns animais multicelulares surpreendentemente complexos, são encontradas nas vizinhanças dessas fumarolas, que podem ter sido os locais da biogênese inicial. [Fonte: P. Rona/OAR/National Undersea Research Program (NURP), NOAA.]

de informações. Uma vez que ribonucleotídeos, os monômeros do RNA, não foram formados nos experimentos sob condições prebióticas, é possível que a evolução prebiótica tenha começado com uma molécula semelhante ao RNA e não com o próprio RNA.

RNA ou precursores semelhantes podem ter sido os primeiros genes e catalisadores

Nos organismos modernos, ácidos nucleicos codificam a informação genética que especifica a estrutura das enzimas, e as enzimas catalisam a replicação e o reparo dos ácidos nucleicos. A dependência mútua dessas duas classes de biomoléculas traz uma pergunta instigante: quem veio primeiro, DNA ou proteína?

A resposta pode ser que ambos surgiram aproximadamente ao mesmo tempo e que o RNA precedeu ambos. A descoberta de que moléculas de RNA podem atuar como catalisadoras da sua própria formação sugere que o RNA, ou uma molécula similar, pode ter sido o primeiro gene e o primeiro catalisador. De acordo com esse cenário (Figura 1-37), um dos primeiros estágios da evolução biológica foi a formação por acaso de uma molécula de RNA que pôde catalisar a formação de outra molécula de RNA com a mesma sequência – uma autorreplicação, um RNA autopropagante. A concentração de uma molécula de RNA autorreplicante crescerá exponencialmente, visto que uma mo-

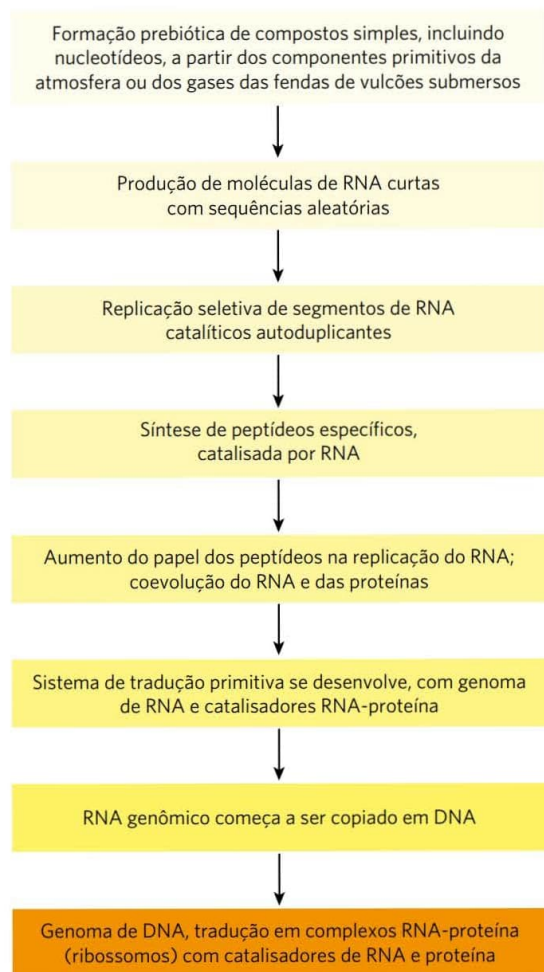


FIGURA 1-37 Possível roteiro para o “mundo do RNA”.

lécua formou várias, várias formaram muitas mais, e assim por diante. A fidelidade da autorreplicação presumivelmente não era perfeita, de modo que o processo gerou variantes do RNA, muitas das quais podendo ser melhores para a autorreplicação. Na competição por nucleotídeos, a mais eficiente entre as sequências autorreplicantes ganharia, e os replicadores menos eficientes se extinguiriam da população.

A divisão de tarefas entre DNA (depósito de informação genética) e proteína (catálise) ocorreu, de acordo com a hipótese do “mundo do RNA”, posteriormente. Novas variantes de moléculas de RNA autorreplicantes se desenvolveram, com a capacidade adicional de catalisar a condensação de aminoácidos em peptídeos. Eventualmente, os peptídeos assim formados puderam reforçar a capacidade do RNA em se autorreplicar, e o par – molécula de RNA e peptídeo auxiliar – poderia passar por modificações adicionais na sequência, gerando sistemas autorreplicantes cada vez mais eficientes. A descoberta extraordinária de que, na maquinaria de síntese de proteínas nas células modernas (ribossomos), as moléculas que catalisam a formação das ligações peptídicas são moléculas de RNA e não de proteína é consistente com a hipótese do mundo do RNA.

Algum tempo após a evolução desse sistema primitivo de síntese proteica, ocorreu um desenvolvimento adicional: moléculas de DNA com sequências complementares às moléculas de RNA autorreplicantes assumiram a função de conservar a informação “genética”, e as moléculas de RNA evoluíram para exercer o seu papel na síntese proteica. (Será explicado no Capítulo 8 por que o DNA é uma molécula mais estável que o RNA e, portanto, um depósito mais adequado para manter a informação hereditária.) As proteínas se revelaram catalisadores versáteis e, com o passar do tempo, assumiram a maior parte dessa função. Compostos semelhantes a lipídeos presentes na mistura primordial formaram camadas relativamente impermeáveis ao redor de conjuntos de moléculas autorreplicantes. A concentração de proteínas e ácidos nucleicos dentro desses invólucros lipídicos favoreceu as interações moleculares necessárias para a autorreplicação.

O cenário do mundo de RNA é intelectualmente satisfatório, mas ele deixa uma questão sem resposta: de onde vieram os nucleotídeos necessários para fazer o RNA inicial? Uma alternativa ao cenário de um mundo de RNA supõe que vias metabólicas simples evoluíram primeiro, talvez nas fontes hidrotermais do leito do oceano. Um conjunto de reações químicas inter-relacionadas nesses locais pode ter produzido os precursores necessários, antes do advento das membranas lipídicas ou RNA. Sem maiores evidências experimentais, nenhuma dessas hipóteses pode ser desconsiderada.

A evolução biológica começou há mais de três bilhões e meio de anos

A Terra se formou há cerca de 4,6 bilhões de anos, e a primeira evidência de vida data de mais de 3,5 bilhões de anos atrás. Em 1996, cientistas trabalhando na Groenlândia encontraram evidências químicas de vida (“moléculas fósseis”) tão antigas quanto 3,85 bilhões de anos, formas de carbono incrustadas em rochas que parecem ter uma origem nitidamente biológica. Em algum lugar da Terra, durante os primeiros bilhões de anos, surgiram os primeiros organismos capazes de replicar sua própria estrutura a partir de um molde (RNA?), que foi o primeiro material genético. Considerando que a atmosfera terrestre no alvorecer da vida estava praticamente desprovida de oxigênio e que existiam poucos microrganismos para decompor os compostos orgânicos formados pelos processos naturais, conclui-se que esses compostos eram relativamente estáveis. Dada essa estabilidade e a enormidade de tempo transcorrido, o improvável se tornou inevitável: vesículas lipídicas contendo compostos orgânicos e RNA autorreplicante deram origem às primeiras células (protocélulas), e essas protocélulas com maior capacidade de autorreplicação se tornaram mais numerosas. Assim, teve início o processo da evolução biológica.

A primeira célula provavelmente usou combustíveis inorgânicos

As células primitivas surgiram em uma atmosfera redutora (não existia oxigênio) e provavelmente obtiveram energia

de compostos inorgânicos, como sulfeto ferroso e carbonato ferroso, ambos abundantes na superfície terrestre. Por exemplo, a reação



produz energia suficiente para impulsionar a síntese de ATP ou compostos semelhantes. Os compostos orgânicos que essas células primitivas precisavam podem ter surgido das ações não biológicas de raios e relâmpagos, do calor dos vulcões ou do calor de fontes hidrotermais no leito do oceano sobre os componentes da atmosfera primitiva: CO, CO₂, N₂, NH₃, CH₄ e outros. Foi proposta uma fonte alternativa de compostos orgânicos: o espaço extraterrestre. As missões espaciais realizadas em 2006 (Stardust) e 2014 (Philae) encontraram partículas na poeira de cometas contendo o mais simples dos aminoácidos (glicina) e 20 outros compostos orgânicos capazes de reagir para formar biomoléculas.

Os organismos unicelulares primitivos adquiriram gradualmente a capacidade de extrair energia de compostos do seu meio e de usar essa energia para sintetizar a maioria das moléculas precursoras de que necessitavam, tornando-se, portanto, menos dependentes de fontes externas. Um evento evolutivo muito significativo foi o desenvolvimento de pigmentos capazes de capturar a energia da luz solar, que pode, então, ser usada para reduzir, ou “fixar”, CO₂ e formar compostos orgânicos mais complexos. Originalmente, o doador de elétrons para esses processos **fotos-sintéticos** provavelmente foi H₂S, produzindo o elemento enxofre ou sulfato de enxofre (SO₄⁴⁻) como produto secundário. Algumas fontes hidrotermais do fundo do mar (fumarolas negras, Figura 1-36) emitem quantidades significativas de H₂, que é um outro possível doador de elétrons no metabolismo dos primeiros organismos. Posteriormente, as células desenvolveram capacidade enzimática para usar H₂O como doador de elétrons em reações fotossintéticas, produzindo O₂ como dejetos. As cianobactérias são os descendentes modernos desses primeiros produtores de oxigênio fotossintético.

Uma vez que a atmosfera da Terra nos estágios iniciais da evolução biológica estava praticamente desprovida de oxigênio, as primeiras células eram anaeróbicas. Sob essas condições, organismos quimiotróficos podiam oxidar compostos orgânicos até CO₂ passando elétrons não para o O₂, mas para aceptores, como SO₄⁴⁻, que produzem H₂S como produto. Com o surgimento das bactérias fotossintéticas produtoras de O₂, a atmosfera tornou-se progressivamente rica em oxigênio – oxidante poderoso e tóxico para organismos anaeróbios. Respondendo à pressão evolutiva que Lynn Margulis e Dorion Sagan chamaram de “holocausto do oxigênio”, algumas linhagens de microrganismos levaram ao surgimento de organismos aeróbios, que obtêm energia passando elétrons das moléculas de combustível ao oxigênio. Devido ao fato de que a transferência de elétrons de moléculas orgânicas ao O₂ libera uma grande quantidade de energia, os organismos aeróbicos tiveram uma vantagem energética sobre os organismos anaeróbicos quando ambos competiam no ambiente contendo oxigênio. Essa vantagem se traduziu na predominância de organismos aeróbicos em ambientes ricos em O₂.

As bactérias e as arqueias modernas habitam praticamente todos os nichos ecológicos da biosfera, e existem organismos capazes de usar praticamente qualquer tipo de composto orgânico como fonte de carbono e energia. Microrganismos fotossintéticos, tanto em água salgada como em água doce, captam energia solar e a utilizam para gerar carboidratos e todos os demais constituintes da célula, que, por sua vez, são usados como alimento pelas outras formas de vida. O processo da evolução continua e, inclusive, pode ser observado em laboratório com células bacterianas que se reproduzem muito rapidamente. Uma linha interessante de pesquisa para estudar os mecanismos da evolução con-

siste em tentar produzir bactérias sintéticas no laboratório (no qual o experimentador fornece todos os componentes comprovadamente puros). O primeiro passo nessa direção consiste em determinar o número mínimo de genes necessários para a vida, examinando o genoma da bactéria mais simples. O menor genoma conhecido de uma bactéria de vida livre é o de *Mycoplasma mycoides*, composto de 1,08 par de megabase (1 par de megabase é um milhão



Lynn Margulis, 1938-2011
[Fonte: Ben Barnhart/UMass Magazine.]

de pares de bases). Em 2010, cientistas do Instituto Craig Venter conseguiram sintetizar *in vitro* o cromossomo do micoplasma, e então incorporaram o cromossomo sintético em uma bactéria viva de outra espécie, *Mycoplasma capricolum* (da qual o DNA havia sido removido) que, por sua vez, adquiriu as propriedades de *M. Mycoides* (Figura 1-38). Essa tecnologia abre caminho para a produção de uma grande variedade de células sintéticas, com o mínimo básico de genes essenciais para a vida. Esses tipos de células abrem a perspectiva de estudar o processo evolutivo em laboratório, processo pelo qual as protocélulas gradualmente se diversificaram e se tornaram mais complexas.

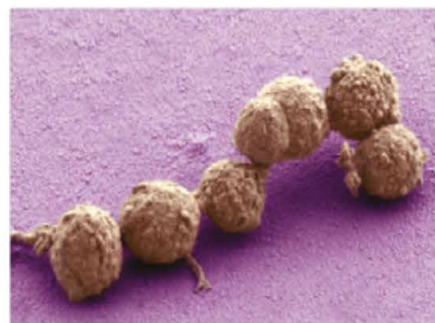


FIGURA 1-38 Células sintéticas. Essas células foram produzidas injetando DNA de *Mycoplasma mycoides* sintetizado em laboratório dentro de um organismo relacionado do qual foi retirado o núcleo, *Mycoplasma capricolum*. As células sintéticas reproduziram-se e apresentaram propriedades específicas do *M. mycoides*. [Fonte: © 2012 National Center for Microscopy & Imaging Research.]

As células eucarióticas evoluíram em vários estágios a partir de precursores mais simples

Registros fósseis, a partir de 1,5 bilhão de anos atrás, começaram a mostrar evidências de organismos maiores e mais complexos, provavelmente as primeiras células eucarióticas (**Figura 1-39**). Detalhes do caminho evolutivo de células não nucleadas para células nucleadas não podem ser deduzidos somente pelo registro fóssil, porém as semelhanças bioquímicas e morfológicas dos organismos modernos sugerem uma sequência de eventos consistente com a evidência fóssil.

Três mudanças principais devem ter ocorrido. Primeiro, à medida que as células adquiriram mais DNA, os mecanismos necessários para um enrolamento compacto em torno de proteínas específicas, formando complexos separados e mantendo a capacidade de promover a divisão correta entre as células-filhas, tornaram-se mais elaborados. Proteínas especializadas foram necessárias para estabilizar o DNA enrolado e para separar os complexos DNA-proteína resultantes (cromossomos) durante a divisão celular. Segundo, à medida que as células se tornaram maiores, um sistema de membranas intracelular se desenvolveu, incluindo uma dupla membrana envolvendo o DNA. Essa membrana segregou o processo nuclear de síntese de RNA a partir do molde de DNA do processo citoplasmático de síntese proteica nos ri-

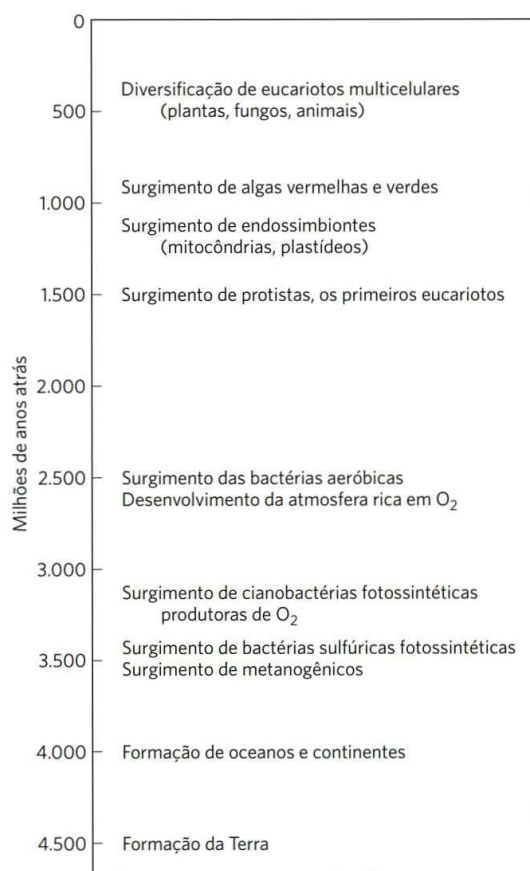


FIGURA 1-39 Marcos da evolução da vida na Terra.

bossomos. Finalmente, de acordo com a hipótese agora amplamente aceita (mas que teve muita resistência no início) e proposta por Lynn Margulis, as primeiras células eucarióticas, que eram incapazes de realizar fotossíntese ou metabolismo aeróbico, englobaram bactérias aeróbicas e bactérias fotossintéticas, formando associações **endossimbióticas** que, por fim, se tornaram permanentes (**Figura 1-40**). Algumas bactérias aeróbicas evoluíram para formarem as mitocôndrias dos eucariotos modernos, e algumas cianobactérias fotossintéticas se tornaram os plastídeos, como os cloroplastos das algas verdes, as prováveis ancestrais das células das plantas modernas.

Em algum estágio posterior da evolução, foi vantajoso para os organismos unicelulares se agregarem, formando aglomerados, adquirindo, assim, maior mobilidade, eficiência ou sucesso reprodutivo em comparação com seus competidores unicelulares livres. Uma evolução adicional desses organismos agregados levou a associações permanentes entre células individuais e, por fim, à especialização dentro da colônia – isto é, à diferenciação celular.

As vantagens da especialização celular levaram à evolução de organismos sempre mais complexos e altamente diferenciados, nos quais algumas células realizavam as funções sensoriais, outras as funções digestivas, outras as fotossintéticas ou reprodutivas, e assim por diante. Muitos organismos multicelulares modernos contêm centenas de tipos de células diferentes, cada qual especializada para uma função de manutenção do organismo como um todo. Mecanismos fundamentais que evoluíram no início tiveram ainda aprimoramentos e refinamentos posteriores com a evolução. Os mesmos mecanismos e estruturas básicas que sustentam o movimento dos cílios no *Paramecium* e do flagelo na *Chlamydomonas* são utilizados, por exemplo, pelos espermatozoides altamente diferenciados dos vertebrados.

A anatomia molecular revela relações evolutivas

Agora, os bioquímicos têm um tesouro de informações muito rico e sempre crescente sobre a anatomia molecular das células, que pode ser usado para analisar as relações evolutivas e refinar a teoria da evolução. A sequência do **genoma**, o legado genético completo de um organismo, foi determinada para centenas de bactérias, para mais de 40 arqueias e para um número crescente de microrganismos eucarióticos, incluindo *Saccharomyces cerevisiae* e espécies de *Plasmodium*; plantas, incluindo *Arabidopsis thaliana* e arroz; e animais multicelulares, incluindo *Caenorhabditis elegans* (um verme), *Drosophila melanogaster* (a mosca-das-frutas), camundongo, rato, cachorro, chimpanzé e *Homo sapiens* (Tabela 1-2). É mesmo possível recuperar amostras de DNA de tecidos de animais extintos, como o homem de Neanderthal e o mamute lanoso, e determinar as sequências (ver Capítulo 8). Com essas sequências em mãos, a comparação detalhada e quantitativa entre as espécies pode dar uma visão mais profunda do processo evolutivo. Até agora, a filogenia molecular inferida da sequência de genes é consistente e, em alguns casos, é até mais precisa que a filogenia clássica baseada em estruturas macroscópicas. Embora os seres vivos tenham divergido continuamente em sua anatomia bruta, em nível molecular a unidade da

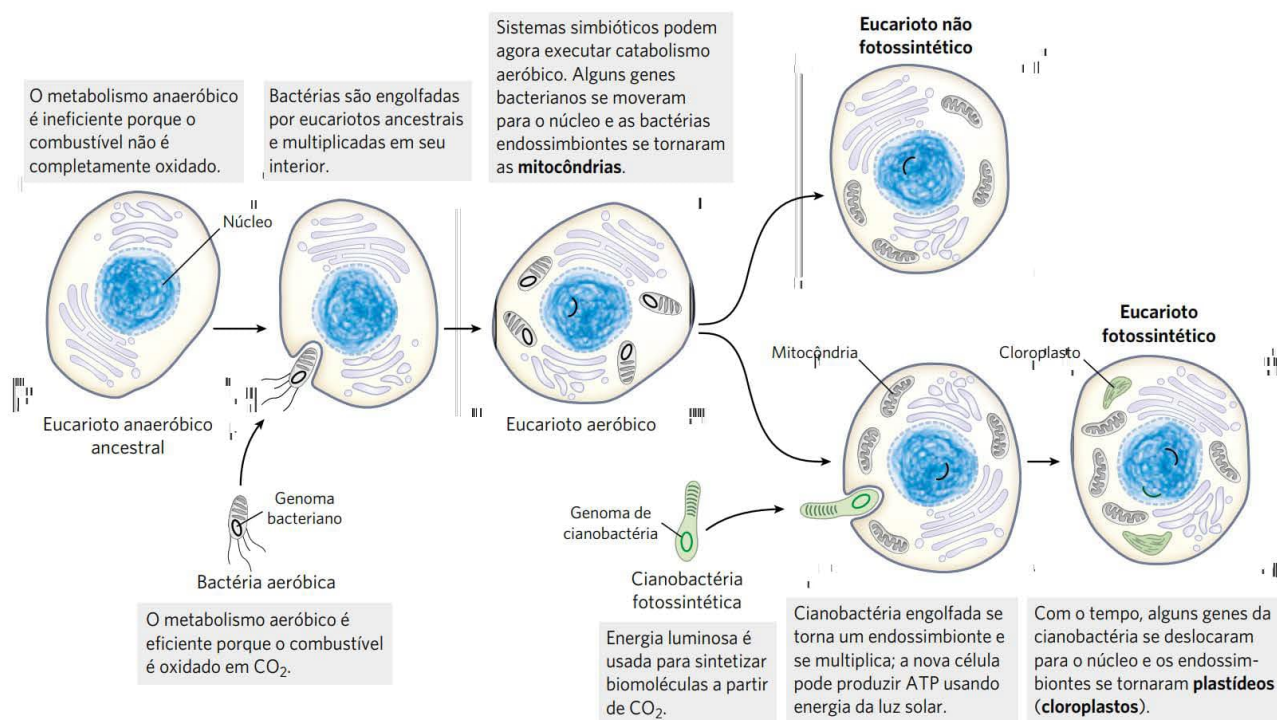


FIGURA 1-40 Evolução dos eucariotos por endossimbiose. O primeiro eucarioto, um anaeróbico, adquiriu uma bactéria púrpura endossimbiótica, que levou consigo a capacidade de fazer catabolismo aeróbico e se tornou, com o tempo, a mitocôndria. Quando a cianobactéria fotossintética se tornou endossimbionte de alguns eucariotos aeróbicos, essas células se tornaram os precursores fotossintéticos das plantas e algas verdes modernas.

TABELA 1-2 Alguns dos muitos organismos cujos genomas foram completamente sequenciados

Organismo	Tamanho do genoma (pares de nucleotídeos)	Interesse biológico
<i>Nanoarchaeum equitans</i>	$4,9 \times 10^5$	Arqueia simbiote marinha
<i>Mycoplasma genitalium</i>	$5,8 \times 10^5$	Bactéria parasita
<i>Helicobacter pylori</i>	$1,6 \times 10^6$	Causa úlcera gástrica
<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	$1,7 \times 10^6$	Arqueia; cresce a 85°C
<i>Haemophilus influenzae</i>	$1,9 \times 10^6$	Causa gripe bacteriana
<i>Synechocystis</i> sp.	$3,9 \times 10^6$	Cianobactéria
<i>Bacillus subtilis</i>	$4,2 \times 10^6$	Bactéria comum do solo
<i>Escherichia coli</i>	$4,6 \times 10^6$	Algumas linhagens são patógenos para o homem
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$1,2 \times 10^7$	Eucarioto unicelular
<i>Caenorhabditis elegans</i>	$1,0 \times 10^8$	Nematódeo
<i>Arabidopsis thaliana</i>	$1,2 \times 10^8$	Planta vascular
<i>Drosophila melanogaster</i>	$1,8 \times 10^8$	Mosca de laboratório (“mosca-das-frutas”)
<i>Mus musculus</i>	$2,7 \times 10^9$	Camundongo
<i>Homo sapiens</i>	$3,0 \times 10^9$	Homem
<i>Paris japonica</i>	$1,5 \times 10^{11}$	Kinugasa japonesa

Fontes: www.ncbi.nlm.nih.gov/genome; J. Pellicer et al., *Bot. J. Linn. Soc.* 164:10, 2010.

vida fica imediatamente clara; estruturas e mecanismos moleculares são muito semelhantes desde os organismos mais simples até os mais complexos. Essas semelhanças são mais facilmente percebidas nas sequências, tanto nas sequências de DNA que codificam proteínas como na própria sequência das proteínas.

Quando dois genes têm sequência com semelhanças facilmente detectáveis (sequência de nucleotídeos no DNA ou sequência de aminoácidos na proteína que eles codificam), essas sequências são ditas homólogas e as proteínas que eles codificam são **homólogos**. Se dois genes homólogos ocorrem na *mesma* espécie, então eles são ditos parálogos e os produtos proteicos também são **parálogos**. Supõe-se que os genes parálogos sejam derivados de duplicação gênica, seguida por mudanças graduais nas sequências de ambas as cópias. Em geral, proteínas parálogas são semelhantes não somente em sequência, mas também na estrutura tridimensional, porém cada uma adquiriu funções diferentes durante a evolução.

Dois genes homólogos (ou proteínas) encontrados em espécies *diferentes* são ditos ortólogos e suas proteínas resultantes são **ortólogos**. Normalmente, as proteínas ortólogas têm a mesma função em ambos os organismos; portanto, quando a sequência de um novo gene de uma espécie for fortemente ortóloga com a sequência de um gene de outra espécie, esse gene provavelmente codifica uma proteína com a mesma função em ambas as espécies. Dessa forma, as funções dos produtos dos genes (proteínas ou moléculas de RNA) podem ser deduzidas a partir da sequência genômica, sem qualquer caracterização bioquímica das moléculas em si. Um **genoma anotado** tem, além da própria sequência de DNA, uma descrição da provável função do produto de cada gene, deduzida por comparação com outras sequências genômicas e funções proteicas já conhecidas. Às vezes, as capacidades metabólicas de um organismo podem ser deduzidas somente a partir da sequência genômica, isto é, pela identificação das vias (conjunto de enzimas) codificadas no genoma.

As diferenças entre as sequências de genes homólogos podem ser usadas como uma medida aproximada do distanciamento entre duas espécies no curso da evolução – isto é, quanto tempo atrás o precursor evolutivo comum deu origem às duas linhagens com destinos evolutivos diferentes. Quanto maior o número de sequências diferentes, mais antiga a divergência na história evolutiva. Pode-se construir uma filogenia (árvore genealógica) na qual a distância evolutiva entre duas espécies quaisquer é representada pela proximidade na árvore (a Figura 1-5 é um exemplo).

No curso da evolução, novos processos, estruturas ou mecanismos regulatórios são adquiridos, o que se reflete em alterações nos genomas dos organismos em evolução. O genoma de um eucarioto simples como a levedura deve ter genes relacionados à formação da sua membrana nuclear, genes esses não presentes nas bactérias ou nas arqueias. O genoma de um inseto deve conter genes que codificam proteínas envolvidas na segmentação característica do corpo, genes esses que não estão presentes na levedura. O genoma de todos os vertebrados deve com-

partilhar genes que especificam o desenvolvimento da coluna vertebral, e o dos mamíferos deve ter os genes característicos necessários para o desenvolvimento da placenta (uma característica dos mamíferos), e assim por diante. A comparação entre genomas completos das espécies de cada filo está levando à identificação de genes cruciais relacionados com mudanças evolutivas fundamentais para determinar a organização corporal e o desenvolvimento dos organismos.

A genômica funcional mostra a alocação de genes para processos celulares específicos

Uma vez que a sequência de um genoma esteja completamente determinada e uma função é associada a cada gene, os geneticistas moleculares podem então agrupar os genes de acordo com o processo (síntese de DNA, síntese proteica, geração de ATP, e assim por diante), no qual eles atuam e encontram qual a parte do genoma que está alocada para cada atividade celular. A maior categoria de genes em *E. coli*, *A. thaliana* e *H. sapiens*, consiste em genes (até agora) de função desconhecida, o que corresponde a mais de 40% dos genes de cada espécie. As proteínas de transporte que movem íons e moléculas pequenas através da membrana plasmática correspondem a uma proporção significativa dos genes em todas essas três espécies, mais em bactérias e plantas do que nos mamíferos (10% dos ~ 4.400 genes de *E. coli*, 8% dos cerca de ~ 27.000 genes de *A. thaliana* e 4% dos ~ 20.000 genes de *H. sapiens*). Os genes que codificam as proteínas e o RNA necessários para síntese proteica somam de 3 a 4% do genoma de *E. coli*, porém, nas células mais complexas de *A. thaliana*, mais genes são necessários para direcionar as proteínas até a sua localização final nas células do que o necessário para sintetizar essas mesmas proteínas (cerca de 6 e 2% do genoma, respectivamente). Em geral, quanto mais complexo o organismo, maior a porção do seu genoma que codifica genes envolvidos na *regulação* de processos celulares e menor a porção dedicada aos processos básicos, como geração de ATP e síntese proteica. Em geral, os **genes constitutivos** (*housekeeping genes*) são expressos em todas as condições e não são muito regulados.

A comparação entre genomas é cada vez mais importante para a biologia e para a medicina humana



Os genomas de chimpanzés e do homem são 99,9% idênticos; mesmo assim, as diferenças entre essas duas espécies são enormes. As poucas diferenças nos conteúdos genéticos devem explicar o domínio da linguagem pelo homem, a extraordinária capacidade física dos chimpanzés e um sem número de outras diferenças. A comparação de genomas está permitindo aos pesquisadores identificar genes candidatos a serem associados com as divergências no programa de desenvolvimento do homem e dos outros primatas e a emergência de funções complexas como a linguagem. Tudo ficará mais claro somente quando o genoma de mais primatas estiver disponível para comparação com o genoma humano.

Da mesma forma, as diferenças no conteúdo genético entre as pessoas são extremamente pequenas se comparadas com as diferenças entre o homem e o chimpanzé. Mesmo assim, essas poucas diferenças são responsáveis pelas diferenças dentro da espécie humana, incluindo diferenças no que se refere à saúde e à suscetibilidade a doenças crônicas. Há muito a se aprender sobre a variabilidade na sequência genômica entre humanos e a disponibilidade dessa informação genômica, o que, com certeza, transformará o diagnóstico e o tratamento de doenças. Muitos estudos fenomenais nos quais sequências de genomas inteiros foram determinadas em centenas ou milhares de pessoas com câncer, diabetes tipo 2, esquizofrenia e outras doenças vem possibilitando identificar muitos genes cujas mutações estão associadas com problemas de saúde. Cada um desses genes codifica para uma proteína que, em princípio, pode vir a ser alvo de medicamentos visando ao tratamento. Vislumbra-se que, no caso de algumas doenças genéticas, os tratamentos paliativos até agora utilizados serão substituídos por curas e medidas preventivas melhores poderão ser tomadas para a suscetibilidade a doenças associadas com marcadores genéticos específicos. O atual “histórico médico” poderá ser substituído pelo “prognóstico médico”. ■

RESUMO 1.5 Fundamentos da evolução

- Ocasionalmente, mutações herdadas geram organismos mais adaptados para sobreviver e se reproduzir em um dado nicho ecológico e, assim, os seus descendentes passam a predominar na população presente nesse nicho. Esse processo de mutação e seleção é a base da evolução darwiniana, que vai desde a primeira célula até todos os organismos atuais. O grande número de genes compartilhados por todos os seres vivos explica as semelhanças fundamentais entre todos eles.
- A vida surgiu há cerca de 3,5 bilhões de anos, mais provavelmente com a formação de um compartimento fechado por membrana contendo uma molécula de RNA autorreplicante. Os componentes das primeiras células podem ter sido produzidos perto de fontes hidrotermais no leito dos oceanos ou pela ação de raios e relâmpagos e altas temperaturas sobre moléculas atmosféricas simples, como CO_2 e NH_3 .
- Os papéis catalíticos e genéticos exercidos pelos primeiros genomas de RNA foram ao longo do tempo sendo realizados por proteínas e DNA, respectivamente.
- Células eucarióticas adquiriram a capacidade de realizar a fotossíntese e a fosforilação oxidativa a partir de bactérias endossimbióticas. Em organismos multicelulares, alguns tipos de células diferenciadas se especializaram em uma ou mais funções essenciais para a sobrevivência do organismo.
- O conhecimento das sequências completas de nucleotídeos dos genomas de organismos de diferentes ramos da árvore filogenética propicia um entendimento mais profundo da evolução e oferece também grandes oportunidades para a medicina humana.

Termos-chave

Todos os termos estão definidos no glossário.

metabólito	3	variação da energia livre, ΔG	23
núcleo	3	reação endoergônica	23
genoma	3	reação exergônica	23
eucarioto	3	equilíbrio	25
bactéria	4	variação da energia livre padrão, ΔG°	26
arqueia	4	energia de ativação, ΔG^\ddagger	28
citoesqueleto	7	catabolismo	28
estereoisômeros	16	anabolismo	28
configuração	16	metabolismo	28
centro quiral	17	biologia de sistemas	29
conformação	19	mutação	32
entropia, S	23	genes constitutivos	39
entalpia, H	23		

Teste seu conhecimento

Seguem alguns problemas relacionados ao conteúdo do capítulo. (Para solucionar os problemas de fim de capítulo, o leitor pode consultar no fim da obra.) Cada problema tem um título para facilitar a referência e a discussão. Observe que as respostas dos problemas numéricos devem ser expressas com o número correto de algarismos significativos. Respostas resumidas estão no Apêndice B.

1. O tamanho das células e seus componentes.

- (a) Se uma célula fosse ampliada 10.000 vezes, ampliação típica conseguida no microscópio eletrônico, qual seria seu tamanho? Considere uma célula eucariótica “típica” com um diâmetro celular de 50 μm .
- (b) Se essa célula fosse uma célula muscular (miócito), quantas moléculas de actina ela poderia conter? Suponha-se que a célula seja esférica e que mais nenhum outro componente celular esteja presente; moléculas de actina são esféricas, com 3,6 nm de diâmetro. O volume da esfera é de $\frac{4}{3}\pi r^3$.
- (c) Se essa fosse uma célula do fígado (hepatócito) com as mesmas dimensões, quantas mitocôndrias ela poderia conter? (Considere que a célula seja esférica, nenhum outro componente celular está presente e a mitocôndria também seja esférica, com 1,5 μm de diâmetro.)
- (d) A glicose é o principal nutriente produtor de energia para a maioria das células. Supondo-se uma concentração celular de 1 mM (i.e., 1 milimol/L), calcule quantas moléculas de glicose poderiam estar presentes nessa célula eucariótica hipotética. (O número de Avogadro, o número de moléculas em 1 mol de substância não ionizada, é $6,02 \times 10^{23}$.)
- (e) Hexocinase é uma enzima importante no metabolismo da glicose. Se a concentração de hexocinase nessa célula eucariótica for de 20 μM , quantas moléculas de glicose estarão presentes para cada molécula de hexocinase?

2. Componentes de *E. coli* Células de *E. coli* em forma de bastão têm cerca de $2\ \mu\text{m}$ de comprimento e $0,8\ \mu\text{m}$ de diâmetro. O volume do cilindro é $\pi r^2 h$, em que h é a altura do cilindro.

- Se a densidade média da *E. coli* (na maior parte água) é $1,1 \times 10^3\ \text{g/L}$, qual é a massa de uma única célula?
- E. coli* tem um envelope de proteção celular de 10 nm de espessura. Qual a porcentagem do volume total da bactéria ocupada pelo envelope?
- E. coli* é capaz de crescer e se multiplicar rapidamente porque contém cerca de 15 mil ribossomos esféricos (diâmetros de 18 nm) que realizam a síntese proteica. Qual porcentagem do volume celular é ocupada pelos ribossomos?

3. Informação genética no DNA de *E. coli* A informação genética contida no DNA consiste em uma sequência linear de unidades codificantes, conhecidas como códons. Cada códon é uma sequência específica de três desoxirribonucleotídeos (três pares de desoxirribonucleotídeos no DNA dupla-fita), e cada códon codifica um resíduo de aminoácido na proteína. O peso molecular de uma molécula de DNA de *E. coli* é de cerca de $3,1 \times 10^9\ \text{g/mol}$. O peso molecular médio do par de nucleotídeo é de 660 g/mol, e cada par de nucleotídeo contribui com 0,34 nm para o comprimento do DNA.

- Calcule o comprimento de uma molécula de DNA de *E. coli*. Compare o comprimento da molécula de DNA com as dimensões da célula (ver Problema 2). Como é que a molécula de DNA cabe dentro da célula?
- Supondo que uma proteína média na *E. coli* consiste em uma cadeia de 400 aminoácidos, qual é o número máximo de proteínas que podem ser codificadas por uma molécula de DNA de *E. coli*?

4. A alta taxa do metabolismo bacteriano As células bacterianas têm taxa de metabolismo muito mais alta que as células animais. Sob condições ideais, algumas bactérias dobram de tamanho e se dividem a cada 20 minutos, enquanto muitas células animais sob condições de crescimento rápido precisam de 24 horas. A alta velocidade do metabolismo bacteriano requer uma relação área de superfície-volume celular alta.

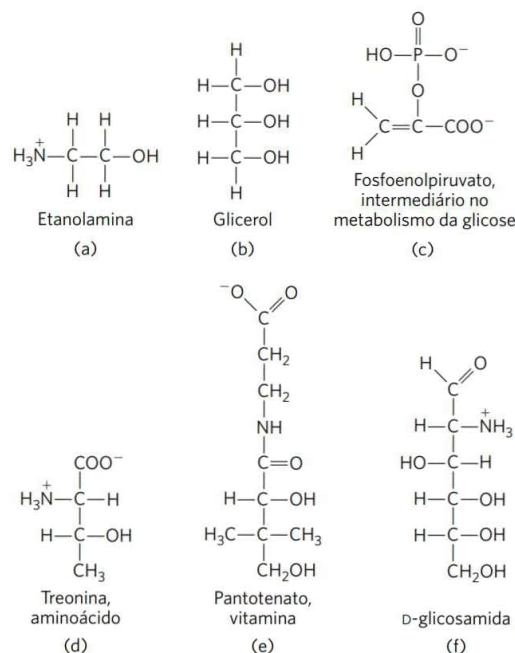
- Por que a relação superfície-volume afeta a velocidade máxima do metabolismo?
- Calcule a relação superfície-volume para a bactéria *Neisseria gonorrhoeae* esférica ($0,5\ \mu\text{m}$ de diâmetro), responsável pela doença gonorreia. Compare essa relação com a relação superfície-volume da ameba, uma grande célula eucariótica ($150\ \mu\text{m}$ de diâmetro). A área da superfície de uma esfera é dada por $4\pi r^2$.

5. O transporte rápido nos axônios Os neurônios têm uma extensão fina e longa, chamada de axônio, uma estrutura especializada em conduzir sinais através do sistema nervoso do organismo. Alguns axônios podem ter 2 m de comprimento – por exemplo, os axônios que se originam na medula espinal e terminam nos músculos dos dedos dos pés. Pequenas vesículas envolvidas por membrana e que carregam materiais essenciais para o funcionamento do axônio se movem ao longo de microtúbulos do citoesqueleto desde o corpo celular até a extremidade dos axônios. Se a velocidade média de uma vesícula é de $1\ \mu\text{m/s}$, quanto tempo levará para a vesícula se mover do corpo celular que está localizado na medula espinal até a ponta axonal nos dedos?

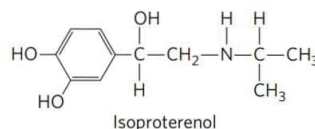
6. A vitamina C sintética é tão boa quanto a vitamina natural? Alguns fornecedores de alimentos naturais alegam que as vitaminas obtidas de fontes naturais são mais saudáveis

do que as obtidas por síntese química. Por exemplo, o ácido L-ascórbico (vitamina C) puro extraído dos frutos da rosa mosqueta seria melhor do que o ácido L-ascórbico puro produzido pela indústria química. Existe alguma diferença entre a vitamina das duas fontes? O organismo é capaz de distinguir a fonte de origem das vitaminas?

7. Identificação de grupos funcionais As Figuras 1-17 e 1-18 mostram alguns grupos funcionais comuns de biomoléculas. Como as propriedades e atividades biológicas das biomoléculas são basicamente determinadas pelos seus grupos funcionais, é importante poder identificá-los. Em cada um dos compostos abaixo, circule e identifique o nome de cada grupo funcional.



8. Atividade de fármacos e estereoquímica. Algumas vezes, as diferenças quantitativas na atividade biológica entre dois enantiômeros de um composto são enormes. Por exemplo, o isômero D do fármaco isoproterenol, usado no tratamento de asma leve, é de 50 a 80 vezes mais efetivo como broncodilatador do que o isômero L. Identifique o centro quiral no isoproterenol. Por que os dois enantiômeros têm bioatividades tão radicalmente diferentes?

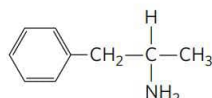


9. Separação de biomoléculas No estudo de uma determinada biomolécula (proteína, ácido nucleico, carboidrato ou lipídeo) no laboratório, o bioquímico primeiro precisa separá-la das outras moléculas da amostra – isto é, precisa *purificá-la*. Técnicas de purificação específicas estão descritas mais adiante no texto. Entretanto, olhando-se as subunidades monoméricas de uma biomolécula, tem-se alguma ideia sobre as características que permitirão separá-la das outras moléculas. Por exemplo, como se poderia separar (a) aminoácidos de ácidos graxos e (b) nucleotídeos de glicose?

10. Vida baseada em silício? O silício está no mesmo grupo do carbono na tabela periódica e, assim como o carbono, pode formar até quatro ligações simples. Muitas histórias de ficção científica se fundamentam na premissa da vida baseada em silício. Será que isso é possível? Quais características do silício o tornam *menos* adaptado que o carbono como elemento central de organização da vida? Para responder, considere o que foi visto sobre a versatilidade das ligações do carbono, e consulte um livro-texto introdutório de química inorgânica sobre as propriedades de ligação do silício.



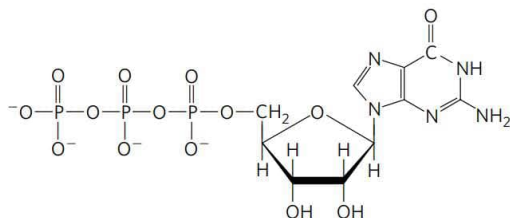
11. A ação dos fármacos e a forma das moléculas Há alguns anos, duas companhias farmacêuticas lançaram no mercado um medicamento sob os nomes comerciais Dexedrina e Benzedrina. A estrutura do fármaco é mostrada abaixo.



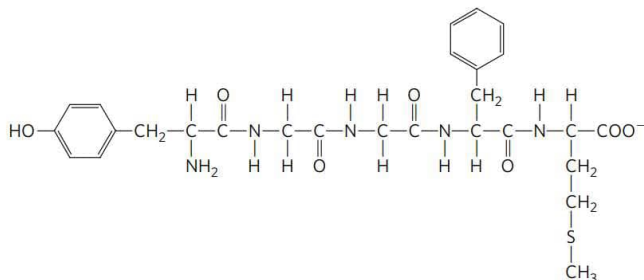
As propriedades físicas (análise de C, H e N, ponto de fusão, solubilidade, etc.) da Dexedrina e de Benzedrina eram idênticas. A dose oral recomendada de Dexedrina (que ainda está disponível nas farmácias) era de 5 mg/dia, mas a dose recomendada de Benzedrina (não mais disponível) era duas vezes esse valor. Aparentemente, havia uma necessidade bem maior de Benzedrina do que de Dexedrina para produzir a mesma resposta fisiológica. Explique essa aparente contradição.

12. Componentes de biomoléculas complexas A Figura 1-11 mostra os principais componentes de biomoléculas complexas. Para cada uma das três biomoléculas importantes mostradas a seguir (na forma ionizada em pH fisiológico), identifique os constituintes.

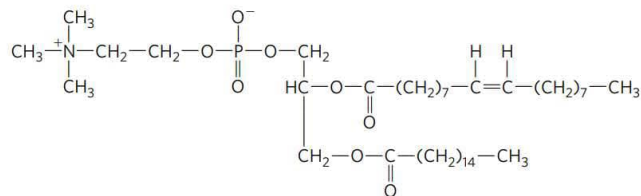
(a) Trifosfato de guanosina (GTP), nucleotídeo rico em energia que serve como precursor do RNA:



(b) Metencefalina, um opioide endógeno:



(c) Fosfatidilcolina, componente de muitas membranas:

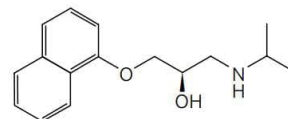


13. Determinação da estrutura de uma biomolécula

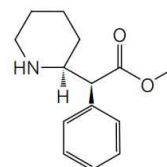
Uma substância desconhecida, X, foi isolada de músculo de coelho. Sua estrutura foi determinada a partir das seguintes observações e experimentos. A análise qualitativa mostrou que X é inteiramente composta por C, H e O. Uma amostra de X foi pesada e oxidada completamente, e H₂O e CO₂ produzidos foram medidos; essa análise quantitativa revelou que X contém 40,00% de C, 6,71% de H e 53,29% de O em peso. A massa molecular de X, determinada por espectrometria de massas, foi 90,00 u (unidades de massa atômica; ver Quadro 1-1). A espectroscopia infravermelha mostrou que X contém uma dupla ligação. X dissolve-se prontamente em água, produzindo uma solução ácida, que apresenta atividade óptica quando testada no polarímetro.

- Determine a fórmula empírica e molecular de X.
- Desenhe as possíveis estruturas de X que se ajustam à fórmula molecular e contém uma ligação dupla. Considere *somente* estruturas lineares e ramificadas e despreze estruturas cíclicas. Observe que o oxigênio faz ligações muito pobres consigo mesmo.
- Qual é o significado estrutural da atividade óptica observada? Quais estruturas em (b) são consistentes com a observação?
- Qual é o significado estrutural da observação de que a solução de X era ácida? Quais estruturas em (b) são consistentes com a observação?
- Qual é a estrutura de X? Mais de uma estrutura é consistente com todos os dados?

14. Nomenclatura de estereoisômeros com um carbono quiral usando o sistema RS Propranolol é um composto quiral. (*R*)-Propranolol é usado como contraceptivo; (*S*)-propranolol é usado no tratamento da hipertensão. Identifique o carbono quiral na estrutura abaixo. Esse é o isômero (*R*) ou (*S*)? Desenhe o outro isômero.



15. Nomenclatura de estereoisômeros com dois carbonos quirais usando o sistema RS O isômero (*R,R*) do metilfenidato (Ritalina) é usado para tratar transtorno de déficit de atenção/hiperatividade (TDAH). O isômero (*S,S*) é um antidepressivo. Identifique os dois carbonos quirais na estrutura abaixo. Este é o isômero (*R,R*) ou (*S,S*)? Desenhe o outro isômero.



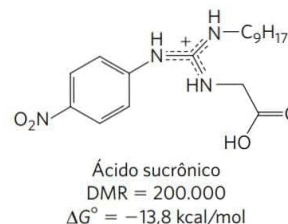
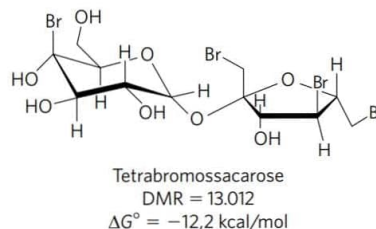
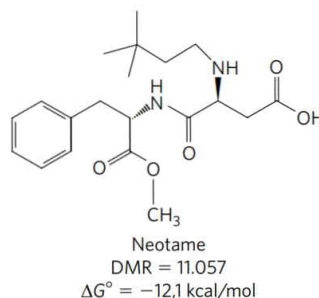
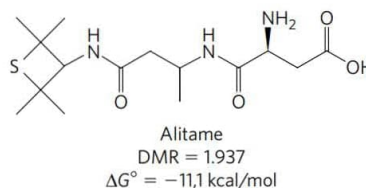
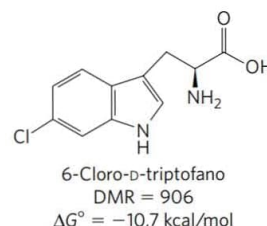
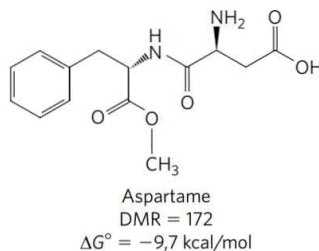
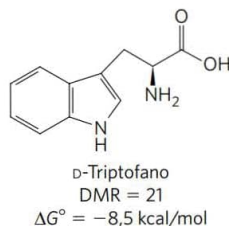
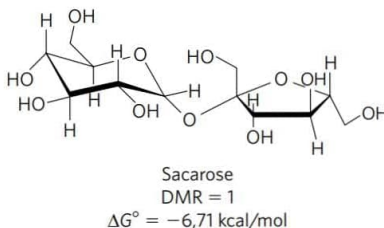
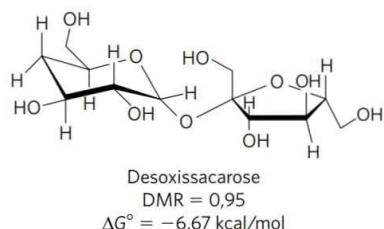
Problema de análise de dados

16. Interação de moléculas de sabor doce com receptores para sabor Muitos compostos têm gosto doce para o homem. O gosto doce resulta da ligação de uma molécula ao receptor doce, um tipo de receptor de sabor, na superfície de certas células da língua. Quanto mais forte a ligação, menor a concentração necessária para saturar o receptor e mais doce será o gosto da uma substância em uma dada concentração. A energia livre padrão, ΔG° , da reação de ligação entre uma molécula doce e um receptor para sabor doce pode ser medida em quilojoules ou quilocalorias por mol.

O gosto doce pode ser quantificado em unidades de “doçura molar relativa” (DMR), uma medida que compara a doçura de uma substância com a doçura da sacarose. Por exemplo, a sacarina tem uma DMR de 161; ou seja, a sacarina é 161 vezes mais doce que a sacarose. Em termos práticos, isso é medido pedindo-se a pessoas voluntárias para comparar a doçura de soluções contendo diferentes concentrações de cada composto. Os gostos da sacarose e da sacarina são igualmente doces quando a sacarose está na concentração 161 vezes maior do que a da sacarina.

(a) Qual é a relação entre DMR e ΔG° da reação de ligação? Especificamente, um ΔG° mais negativo corresponde a uma DMR maior ou menor? Explique o raciocínio utilizado.

A seguir são mostradas as estruturas de 10 compostos, todos de sabor doce para o homem. A DMR e o ΔG° de ligação ao receptor para doce são dados para cada substância.



Morini, Bassoli e Temussi (2005) utilizaram métodos computacionais (frequentemente referidos como métodos “*in silico*”) para modelar a ligação de moléculas doces a receptores para doce.

(b) Por que é útil ter um modelo de computador para prever a doçura de moléculas, em vez de fazer ensaios de sabor usando-se pessoas e animais?

Em um trabalho anterior, Schallenberger e Acree (1967) sugeriram que todas as moléculas doces incluem o grupo estrutural “AH-B”, no qual “A e B são átomos eletronegativos separados por uma distância maior que 2,5 Å [0,25 nm], mas menor que 4 Å [0,4 nm]. H é um átomo de hidrogênio ligado a um dos átomos eletronegativos por uma ligação covalente”.

- (c) Dado que o comprimento de uma ligação simples “típica” é de cerca de 0,15 nm, identifique o(s) grupo(s) AH-B em cada molécula mostrada à esquerda.
- (d) Com base nos resultados do item (c), proponha duas objeções à afirmação de que “moléculas contendo uma estrutura AH-B terão gosto doce”.
- (e) No caso de duas das moléculas mostradas, o modelo AH-B *pode* ser usado para explicar a diferença de valores de DMR e ΔG° . Quais são essas duas moléculas e como podem ser usadas para defender o modelo AH-B?
- (f) Muitas das moléculas têm estruturas parecidas, mas valores de DMR e ΔG° muito diferentes. Dê dois exemplos e use-os para argumentar que o modelo AH-B é incapaz de explicar as diferenças observadas na doçura.

Em seus estudos de modelos computacionais, Morini e colaboradores usaram a estrutura tridimensional do receptor doce e um programa de modelagem de dinâmica molecular chamado de GRAMM para predizer o valor de

ΔG° da ligação de moléculas doces ao receptor de doce. Primeiro, eles “treinaram” o modelo que propuseram – isto é, aprimoraram os parâmetros de modo que os valores de ΔG° preditos pelo modelo se ajustavam ao valor conhecido de ΔG° para um conjunto de moléculas doces (“conjunto de treino”). Em seguida, “testaram” o modelo indagando a predição dos valores de ΔG° para um novo conjunto de moléculas (“conjunto de teste”).

- (g) Explique por que Morini e colaboradores tiveram que testar o modelo com um conjunto de moléculas diferentes do conjunto de moléculas usadas para treinar o modelo?
- (h) Os pesquisadores constataram que os valores de ΔG° previstos para o conjunto de teste diferiram dos valores corretos, na média, em 1,3 kcal/mol. Usando os valores dados para as estruturas moleculares apresentadas, estime o erro resultante nos valores de DMR.

Referências

- Morini, G., Bassoli, A. e Temussi, P.A.** (2005) From small sweeteners to sweet proteins: anatomy of the binding sites of the human T1R2_T1R3 receptor. *J. Med. Chem.* 48, 5520–5529.
- Schallenberger, R.S. e Acree, T.E.** (1967) Molecular theory of sweet taste. *Nature* 216, 480–482.

Estrutura e catálise

2	Água	47
3	Aminoácidos, peptídeos e proteínas	75
4	Estrutura tridimensional das proteínas	115
5	Função proteica	157
6	Enzimas	187
7	Carboidratos e glicobiologia	241
8	Nucleotídeos e ácidos nucleicos	279
9	Tecnologias de informação baseadas no DNA	319
10	Lípídeos	361
11	Membranas biológicas e transporte	387
12	Biossinalização	437

A bioquímica nada mais é que a “química da vida” e, claro, a vida pode ser investigada, analisada e compreendida. Para começar a estudar este campo, todo estudante de bioquímica precisa dominar tanto uma linguagem quanto alguns princípios e isso está apresentado na Parte I.

Os capítulos da Parte I são dedicados à estrutura e à função das principais classes de constituintes celulares: água (Capítulo 2), aminoácidos e proteínas (Capítulos 3 a 6), açúcares e polissacarídeos (Capítulo 7), nucleotídeos e ácidos nucleicos (Capítulo 8), ácidos graxos e lipídeos (Capítulo 10) e, finalmente, membranas e proteínas sinalizadoras presentes na membrana (Capítulos 11 e 12). Também são discutidas, no contexto de estrutura e função, as técnicas utilizadas no estudo de cada tipo de biomolécula. Um capítulo inteiro (Capítulo 9) é dedicado às biotecnologias relacionadas com a clonagem e a genômica.

O Capítulo 2 aborda a água porque as propriedades dela afetam a estrutura e a função de todos os demais constituintes celulares. Para cada uma das classes de moléculas orgânicas, primeiro será visto a química covalente das unidades monoméricas (aminoácidos, monossacarídeos, nucleotídeos e ácidos graxos) e depois a descrição da estrutura das ma-

cromoléculas e dos complexos supramoleculares delas derivados. Um tema relevante é que, nos sistemas vivos, embora sejam grandes, as macromoléculas são entidades químicas altamente ordenadas com sequências específicas de subunidades monoméricas que lhes conferem estruturas e funções particulares. Esse tema fundamental pode ser subdividido em três princípios básicos que se inter-relacionam: (1) a estrutura particular de cada macromolécula determina as suas funções; (2) interações não covalentes desempenham um papel crucial na determinação das estruturas e das funções das macromoléculas; e (3) as subunidades monoméricas dos polímeros estão em sequências específicas, o que constitui uma forma de informação da qual depende o estado de organização do ser vivo.

A relação entre estrutura e função é especialmente evidente nas proteínas, que apresentam uma diversidade de funções imensa. Determinada sequência polimérica de aminoácidos produz uma estrutura fibrosa resistente, encontrada no cabelo e na lã; outra sequência produz uma proteína que transporta oxigênio no sangue; uma terceira liga outras proteínas e catalisa a clivagem das ligações entre aminoácidos. De maneira semelhante, as funções especiais de polissacarídeos, de ácidos nucleicos e de lipídeos podem ser compreendidas como o resultado direto das suas estruturas químicas, com subunidades monoméricas características ligadas com precisão para formar polímeros funcionais. Açúcares ligados entre si se tornam depósitos de energia, de fibras estruturais e de pontos para reconhecimento moleculares específicos; nucleotídeos enfileirados ao longo do DNA ou do RNA fornecem as informações para um organismo inteiro; e lipídeos agregados formam membranas. O Capítulo 12 unifica a discussão das funções das biomoléculas, descrevendo como sistemas sinalizadores específicos regulam as atividades das biomoléculas – dentro de uma célula, dentro de um órgão e entre órgãos – para manter um organismo em homeostasia.

À medida que se passa das unidades monoméricas para polímeros cada vez maiores, o foco químico muda de ligações covalentes para interações não covalentes. Liga-

ções covalentes em nível monomérico e macromolecular impõem restrições às formas que as biomoléculas grandes podem assumir. As interações não covalentes são muito numerosas e ditam a conformação nativa estável das moléculas grandes e, ao mesmo tempo, permitem a flexibilidade necessária para a respectiva função biológica. Como será visto, interações não covalentes são essenciais à capacidade catalítica das enzimas, à interação crítica entre bases complementares nos ácidos nucleicos e ao arranjo e propriedades de lipídeos e membranas. O princípio de que sequências de subunidades monoméricas são ricas em informação está mais evidente na discussão dos ácidos nucleicos (Capítulo 8). Além dos ácidos nucleicos, proteínas e alguns polímeros curtos de açúcares (oligossacarídeos) também são moléculas ricas em informação. A sequência

de aminoácidos é uma forma de informação e direciona o enovelamento da proteína para assumir sua estrutura tridimensional única, a qual determina sua função de proteína. Alguns oligossacarídeos também têm sequências e estruturas tridimensionais únicas, que são reconhecidas por outras macromoléculas.

Cada classe de moléculas tem uma hierarquia estrutural semelhante: subunidades de estrutura fixa são conectadas por ligações de flexibilidade limitada e formam macromoléculas com estruturas tridimensionais determinadas por interações não covalentes. Essas macromoléculas interagem para formar estruturas supramoleculares e organelas, que permitem à célula desempenhar as suas várias funções metabólicas. No seu conjunto, as moléculas descritas na Parte I são o material da vida.

Água

- 2.1 Interações fracas em sistemas aquosos 47
- 2.2 Ionização da água e de ácidos e bases fracos 58
- 2.3 Tamponamento contra mudanças no pH em sistemas biológicos 63
- 2.4 A água como reagente 69
- 2.5 O ajuste do meio aquoso em organismos vivos 69

A água é a substância mais abundante nos sistemas vivos, constituindo mais de 70% do peso da maioria dos seres vivos. O primeiro organismo vivo na Terra, sem dúvida, apareceu em um ambiente aquoso, e o curso da evolução foi moldado pelas propriedades do meio aquoso no qual a vida começou.

Este capítulo inicia com descrições das propriedades físicas e químicas da água, à qual, em todos os aspectos, a estrutura e a função da célula estão adaptadas. As forças de atração entre as moléculas da água e a pequena tendência da água em ionizar são de crucial importância para a estrutura e a função das biomoléculas. Será revisado o tópico da ionização em termos das constantes de equilíbrio, pH e curvas de titulação e discutido como as soluções aquosas de ácidos fracos ou bases fracas e seus sais agem como tampão que se contrapõe a mudanças de pH em sistemas biológicos. A molécula de água e seus produtos de ionização, H^+ e OH^- , influenciam profundamente a estrutura, a organização e as propriedades de todos os componentes celulares, incluindo proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos. As interações não covalentes responsáveis pela intensidade e especificidade do reconhecimento entre as biomoléculas são influenciadas decisivamente pelas propriedades da água como solvente, incluindo a capacidade de formar ligações de hidrogênio com ela mesma e com solutos.

2.1 Interações fracas em sistemas aquosos

As ligações de hidrogênio entre moléculas de água fornecem as forças coesivas que fazem da água um líquido à temperatura ambiente e um sólido cristalino (gelo) com arranjo altamente ordenado de moléculas em temperaturas frias. As biomoléculas polares dissolvem-se facilmente em água, uma vez que elas podem substituir interações entre as moléculas de água (água-água) por interações energeticamente mais

favoráveis entre a água e o soluto (água-soluto). Por outro lado, as biomoléculas apolares são muito pouco solúveis em água, uma vez que elas interferem nas interações do tipo água-água, mas são incapazes de formar interações água-soluto. Em soluções aquosas, moléculas apolares tendem a formar agregados. Ligações de hidrogênio e interações iônicas, hidrofóbicas (do grego, “medo de água”) e forças de van der Waals são individualmente fracas, mas quando em conjunto elas têm influência significativa sobre as estruturas tridimensionais de proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos e lipídeos de membranas.

Ligações de hidrogênio são responsáveis pelas propriedades incomuns da água

A água tem ponto de fusão, ebulição e calor de vaporização mais altos que os outros solventes comuns (Tabela 2-1). Essas propriedades incomuns são uma consequência da atração que ocorre entre moléculas de água adjacentes e que oferece à água líquida uma grande coesão interna. A visualização da estrutura eletrônica da molécula de H_2O revela a origem dessas atrações intermoleculares.

Cada átomo de hidrogênio de uma molécula de água compartilha um par de elétrons com o átomo central do oxigênio. A geometria da molécula é ditada pela forma dos orbitais eletrônicos mais externos do átomo de oxigênio, que são similares aos orbitais sp^3 da ligação ao carbono (ver Figura 1-16). Esses orbitais podem ser descritos como tendo um formato aproximado de tetraedro, com um átomo de hidrogênio em cada um de dois dos vértices e pares de elétrons não compartilhados nos outros dois (**Figura 2-1a**). O ângulo de ligação $H-O-H$ é de $104,5^\circ$. Isso é levemente menor que o ângulo $109,5^\circ$ de um tetraedro perfeito em consequência do agrupamento dos orbitais não ligantes do átomo de oxigênio.

O núcleo do átomo de oxigênio atrai elétrons mais fortemente que o núcleo de hidrogênio (um próton); ou seja, o oxigênio é mais eletronegativo. Assim, os elétrons compartilhados geralmente estão mais nas vizinhanças do átomo de oxigênio do que nas vizinhanças do átomo de hidrogênio. O resultado desse compartilhamento desigual de elétrons é a formação, na molécula de água, de dois dipolos elétricos, um ao longo de cada ligação $O-H$; cada hidrogênio carrega carga parcial positiva (δ^+) e o oxigênio carrega carga parcial negativa igual em magnitude à soma das duas cargas parciais positivas ($2\delta^+$). Isso resulta em uma atração eletrostática

TABELA 2-1 Ponto de fusão, ponto de ebulição e calor de vaporização de alguns solventes comuns

	Ponto de fusão (°C)	Ponto de ebulição (°C)	Calor de vaporização (J/g) ^a
Água	0	100	2.260
Metanol (CH ₃ OH)	-98	65	1.100
Etanol (CH ₃ CH ₂ OH)	-117	78	854
Propanol (CH ₃ CH ₂ CH ₂ OH)	-127	97	687
Butanol (CH ₃ (CH ₂) ₂ CH ₂ OH)	-90	117	590
Acetona (CH ₃ COCH ₃)	-95	56	523
Hexano (CH ₃ (CH ₂) ₄ CH ₃)	-98	69	423
Benzeno (C ₆ H ₆)	6	80	394
Butano (CH ₃ (CH ₂) ₂ CH ₃)	-135	-0,5	381
Clorofórmio (CHCl ₃)	-63	61	247

^a A energia, na forma de calor, necessária para levar 1 g de um líquido no seu ponto de ebulição e na pressão atmosférica até seu estado gasoso na mesma temperatura. Essa é uma medida direta da energia necessária para superar as forças de atração entre as moléculas na fase líquida.

tica entre o átomo de oxigênio de uma molécula de água e o hidrogênio de outra (Figura 2-1b), chamada de **ligação de hidrogênio**. Ao longo deste livro, as ligações de hidrogênio serão representadas com três linhas paralelas azuis, como na Figura 2-1b.

Ligações de hidrogênio são relativamente fracas. As ligações de hidrogênio em água líquida têm **energia de dissociação de ligação** (a energia requerida para quebrar uma ligação) de cerca de 23 kJ/mol, em comparação com 470 kJ/mol para uma ligação covalente O—H em água e 348 kJ/mol para uma ligação covalente C—C. A ligação de hidrogênio é cerca de 10% covalente, devido às sobreposições nos orbitais de ligação, e cerca de 90% eletrostática.

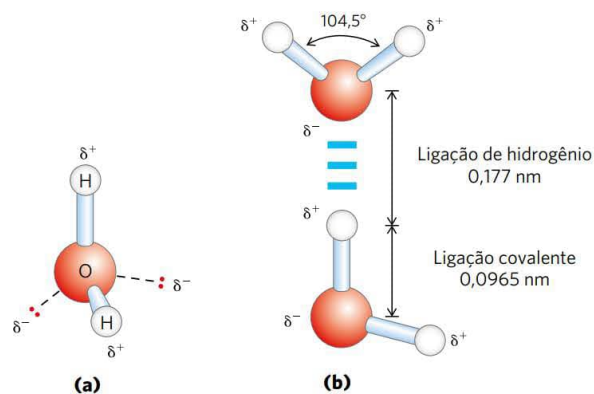


FIGURA 2-1 Estrutura da molécula de água. **(a)** A natureza dipolar da molécula de água mostrada em modelo de esfera e bastão; as linhas tracejadas representam os orbitais não ligantes. Há um arranjo quase tetraédrico do par de elétrons da camada mais externa ao redor do átomo de oxigênio. Os dois átomos de hidrogênio têm carga parcial positiva (δ^+) e o átomo de oxigênio tem carga parcial negativa (δ^-). **(b)** Duas moléculas de H₂O unidas por ligação de hidrogênio (representada aqui e ao longo deste livro por três linhas azuis) entre o átomo de oxigênio da molécula de água mais acima e um átomo de hidrogênio da molécula mais abaixo. As ligações de hidrogênio são mais longas e mais fracas que as ligações covalentes O—H.

Em temperatura ambiente, a energia térmica de uma solução aquosa (a energia cinética do movimento de átomos individuais e moléculas) é da mesma ordem de magnitude que a necessária para quebrar ligações de hidrogênio. Quando a água é aquecida, o aumento da temperatura se reflete em um aumento da velocidade individual das moléculas de água. Em qualquer momento dado, a maioria das moléculas na água líquida é ligada por ligações de hidrogênio, mas cada ligação de hidrogênio dura somente de 1 a 20 picossegundos ($1 \text{ ps} = 10^{-12} \text{ s}$); quando uma ligação de hidrogênio quebra, em 0,1 ps, uma outra ligação de hidrogênio se forma com a mesma molécula ou então com outra molécula de água. A expressão *agrupamentos oscilantes* vem sendo aplicada aos grupos de moléculas de água interligadas por ligações de hidrogênio de vida curta na água líquida. A soma de todas as ligações de hidrogênio entre as moléculas de água confere à água líquida uma grande coesão interna. Redes estendidas de moléculas de água unidas por ligações de hidrogênio também formam pontes entre solutos (proteínas e ácidos nucleicos) que permitem que as moléculas maiores interajam umas com as outras por distâncias de vários nanômetros sem se tocarem fisicamente.

O arranjo aproximadamente tetraédrico dos orbitais ao redor do átomo de oxigênio (Figura 2-1a) permite que cada molécula de água forme ligações de hidrogênio com até quatro moléculas de água vizinhas. Na água líquida, em temperatura ambiente e pressão atmosférica, entretanto, as moléculas de água estão desorganizadas e em movimento contínuo, assim cada molécula forma ligação de hidrogênio com somente 3,4 outras moléculas, em média. No gelo, por outro lado, cada molécula de água está fixa no espaço e forma ligações de hidrogênio com quatro outras moléculas, formando uma estrutura de rede regular (**Figura 2-2**). As ligações de hidrogênio são responsáveis pelo ponto de fusão relativamente alto da água, pois é necessária muita energia térmica para quebrar uma proporção suficiente de ligações de hidrogênio para desestabilizar a rede cristalina

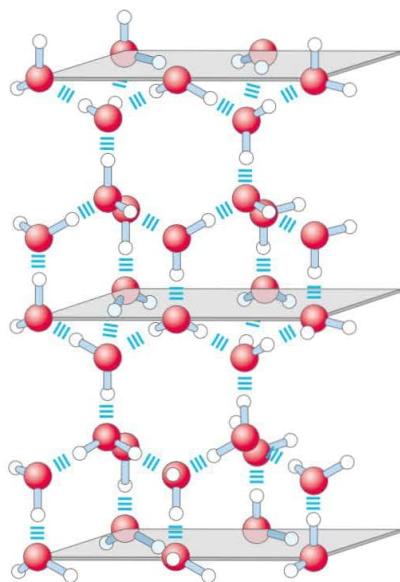
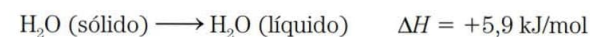


FIGURA 2-2 **Ligações de hidrogênio no gelo.** No gelo, cada molécula de água forma quatro ligações de hidrogênio, o máximo possível para uma molécula de água, criando uma estrutura de rede cristalina regular. Por outro lado, na água líquida em temperatura ambiente e pressão atmosférica, cada molécula de água faz uma média de 3,4 ligações de hidrogênio com outras moléculas. Essa rede cristalina regular faz o gelo ser menos denso que a água líquida; portanto, o gelo flutua na água líquida.

do gelo (Tabela 2-1). Quando o gelo funde ou a água evapora, é retirado calor do meio, pelo sistema:



Durante a fusão ou a evaporação, a entropia do sistema aquoso aumenta à medida que as disposições mais ordenadas das moléculas de água em forma de gelo passam a assumir disposições menos ordenadas no estado líquido ou completamente desordenadas no estado gasoso. Em temperatura ambiente, tanto a fusão do gelo quanto a evaporação da água ocorrem espontaneamente. A tendência das moléculas de água em se associarem por meio de ligações de hidrogênio é compensada pela tendência energética para a desordem. Lembre-se que, para um processo ocorrer espontaneamente, a energia livre (ΔG) deve ter um valor negativo: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, em que ΔG representa a força motriz, ΔH a mudança de entalpia para formar e romper ligações e ΔS a mudança no nível de desordem. Como ΔH é positivo para a fusão e a evaporação, fica evidente que é o aumento na entropia (ΔS) que torna ΔG negativo e impulsiona a mudança de estado.

A água forma ligações de hidrogênio com solutos polares

Formar ligações de hidrogênio não é uma exclusividade da molécula de água. Elas se formam prontamente entre um átomo eletronegativo (aceptor de hidrogênio, geralmente oxigênio ou nitrogênio) e um átomo de hidrogênio ligado covalentemente a outro átomo eletronegativo (doador de hidrogênio) na mesma molécula, ou em outra (Figura 2-3). Átomos de hidrogênio covalentemente ligados a átomos de

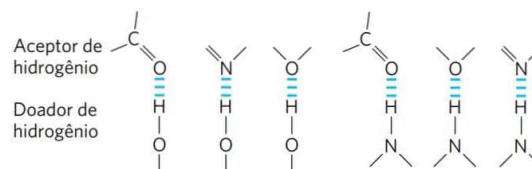


FIGURA 2-3 **Ligações de hidrogênio comuns em sistemas biológicos.** O acceptor de hidrogênio geralmente é o oxigênio ou o nitrogênio; o doador de hidrogênio é outro átomo eletronegativo.

carbono não participam de ligações de hidrogênio, uma vez que o átomo de carbono é apenas levemente mais eletronegativo que o hidrogênio e, portanto, a ligação C—H é muito pouco polar. Essa diferença explica por que o butano ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$) tem um ponto de ebulição de apenas $-0,5^\circ\text{C}$, ao passo que o butanol ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{OH}$) tem um ponto de ebulição relativamente alto, 117°C . O butanol tem um grupo hidroxila polar e, assim, pode haver ligações de hidrogênio entre suas moléculas. Biomoléculas polares não carregadas, como os açúcares, dissolvem-se rapidamente em água devido ao efeito estabilizador das ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila ou o oxigênio da carbonila do açúcar com as moléculas polares da água. Alcoóis, aldeídos, cetonas e compostos contendo ligações N—H formam ligações de hidrogênio com moléculas de água (Figura 2-4) e tendem a ser solúveis em água.

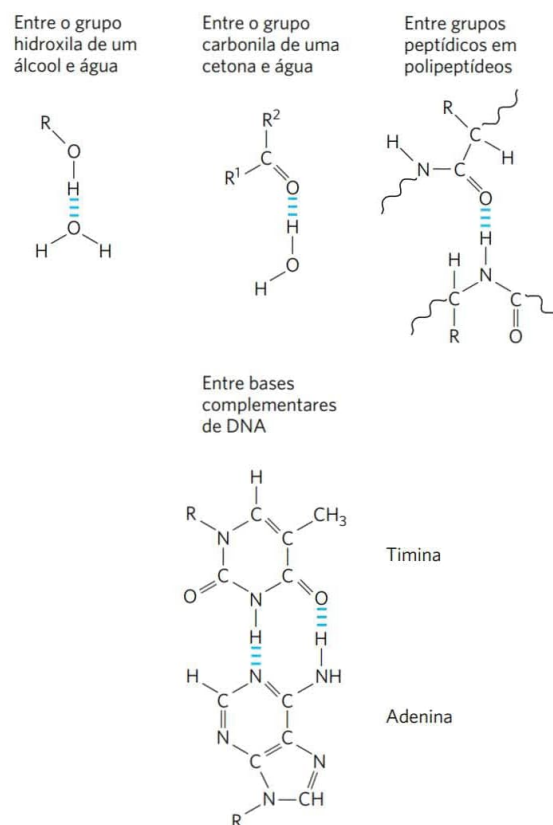


FIGURA 2-4 **Algumas ligações de hidrogênio de importância biológica.**

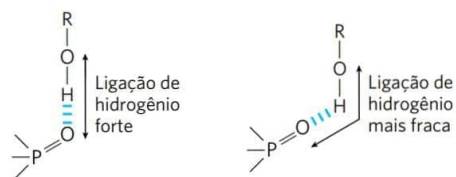


FIGURA 2-5 Orientação das ligações de hidrogênio. A atração entre as cargas elétricas parciais (ver Figura 2-1) é máxima quando os três átomos envolvidos na ligação (nesse caso, O, H e O) estão dispostos em linha reta. Quando as partes da molécula que fazem ligações de hidrogênio estão submetidas a restrições estruturais (p. ex., quando é parte de uma molécula de proteína) esta geometria ideal já não é mais possível e isso faz as ligações de hidrogênio serem mais fracas.

As ligações de hidrogênio são mais fortes quando as moléculas ligadas estão orientadas de forma a maximizar as interações eletrostáticas. Isso ocorre quando o átomo de hidrogênio e os dois átomos que o compartilham estão em linha reta – isto é, quando o átomo aceptor está alinhado com a ligação covalente entre o átomo doador e o hidrogênio (**Figura 2-5**). Esse arranjo dispõe as cargas positivas do íon hidrogênio diretamente entre as duas cargas parciais negativas. As ligações de hidrogênio são, portanto, altamente direcionais e capazes de manter duas moléculas ou grupos unidos por ligações de hidrogênio em um arranjo com geometria específica. Como será visto posteriormente, essa propriedade das ligações de hidrogênio confere estruturas tridimensionais muito precisas a moléculas de proteínas e de ácidos nucleicos, pois elas possuem muitas ligações de hidrogênio intramoleculares.

A água interage eletrostaticamente com solutos carregados

A água é um solvente polar. Ela dissolve prontamente a maioria das biomoléculas, que, em geral, são compostos car-

regados ou polares (Tabela 2-2); compostos que se dissolvem facilmente em água são **hidrofílicos** (do grego, “que ama a água”). Em contrapartida, solventes apolares, como clorofórmio e benzeno, são solventes inadequados para biomoléculas polares, mas dissolvem prontamente moléculas **hidrofóbicas** – moléculas apolares, como lipídeos e ceras.

A água dissolve sais como o NaCl pela hidratação e estabilização dos íons Na^+ e Cl^- , enfraquecendo as interações eletrostáticas entre eles e, portanto, neutralizando a tendência de se associarem em uma rede cristalina (**Figura 2-6**). A água também dissolve prontamente biomoléculas carregadas, incluindo compostos com grupos funcionais, como grupos carboxílicos ionizados ($-\text{COO}^-$), aminas protonadas ($-\text{NH}_3^+$) e ésteres de fosfato ou anidridos. A água substitui as ligações de hidrogênio soluto-soluto, conectando essas biomoléculas umas com as outras por ligações de hidrogênio soluto-água, blindando as interações eletrostáticas entre as moléculas de soluto.

A água é efetiva na blindagem de interações eletrostáticas entre íons dissolvidos devido à sua alta constante dielétrica, uma propriedade física que reflete o número de dipolos de um solvente. A intensidade, ou força (F), das interações iônicas depende da magnitude das cargas (Q), da distância entre os grupos carregados (r) e da constante dielétrica (ϵ , que é adimensional) do solvente no qual as interações ocorrem:

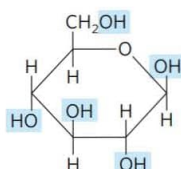
$$F = \frac{Q_1 Q_2}{\epsilon r^2}$$

Para água a 25°C , ϵ é 78,5, e para o solvente muito apolar benzeno, ϵ é 4,6. Portanto, as interações iônicas entre os íons dissolvidos são muito mais fortes em ambiente menos polar. A dependência de r^2 é tal que a atração ou repulsão iônica opera somente a pequenas distâncias – na faixa de 10 a 40 nm (dependendo da concentração do eletrólito) quando o solvente é água.

TABELA 2-2 Alguns exemplos de biomoléculas polares, apolares e anfipáticas (mostradas nas suas formas ionizadas em pH 7)

Polar

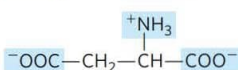
Glicose



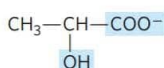
Glicina



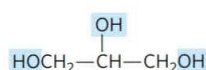
Aspartato



Lactato

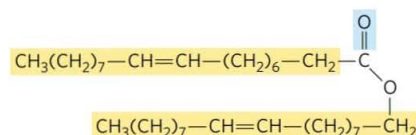


Glicerol



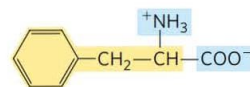
Apolar

Cera comum

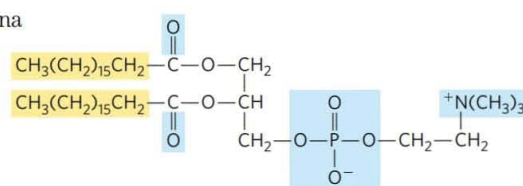


Anfipática

Fenilalanina



Fosfatidilcolina



Grupos polares Grupos apolares

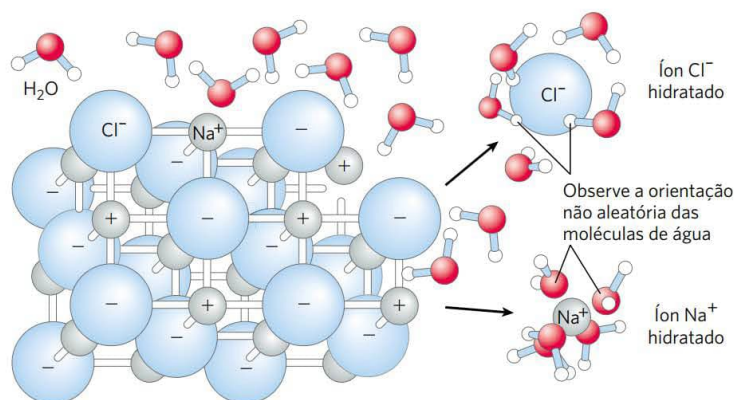


FIGURA 2-6 A água como solvente. A água dissolve muitos sais cristalinos pela hidratação de seus íons. A rede cristalina do NaCl se desfaz quando moléculas de água se aglomeram ao redor dos íons Cl^- e Na^+ . As cargas iônicas são parcialmente neutralizadas, e as atrações eletrostáticas necessárias para a formação da rede são enfraquecidas.

A entropia aumenta quando uma substância cristalina se dissolve

Logo que um sal como o NaCl se dissolve, os íons Na^+ e Cl^- abandonam a rede cristalina e adquirem uma liberdade muito maior de movimento (Figura 2-6). O aumento resultante na entropia do sistema (grau de desordem) é em grande parte responsável pela facilidade da dissolução de sais como NaCl em água. Em termos termodinâmicos, a formação de uma solução ocorre com uma variação favorável de energia livre: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, em que ΔH tem um valor positivo pequeno e $T\Delta S$ um valor positivo grande; então ΔG é negativo.

Gases apolares são fracamente solúveis em água

As moléculas de gases biologicamente importantes como CO_2 , O_2 e N_2 são apolares. No caso de O_2 e N_2 , os elétrons são compartilhados igualmente por ambos os átomos da ligação. No CO_2 , cada ligação $\text{C}=\text{O}$ é polar, mas os dois dipolos estão em direções antagônicas e anulam um ao outro (Tabela 2-3). A adição de moléculas da fase gasosa desordenada a uma solução aquosa restringe o movimento do gás e das moléculas de água e, portanto, leva a um decréscimo de entropia. A combinação entre a natureza apolar desses gases e o decréscimo de entropia quando eles entram na

solução os torna muito pouco solúveis em água (Tabela 2-3). Alguns organismos têm “proteínas transportadoras” solúveis em água (p. ex., hemoglobina e mioglobina) que facilitam o transporte de O_2 . O dióxido de carbono forma o ácido carbônico (H_2CO_3) em solução aquosa que é transportado como íon bicarbonato (HCO_3^-) livre – bicarbonato é muito solúvel em água ($\sim 100 \text{ g/L}$ a 25°C) – ou ligado à hemoglobina. Três outros gases, NH_3 , NO e H_2S , também têm papéis biológicos em alguns organismos; esses gases são polares, dissolvem-se facilmente em água e ionizam em solução aquosa.

Compostos apolares forçam mudanças energeticamente desfavoráveis na estrutura da água

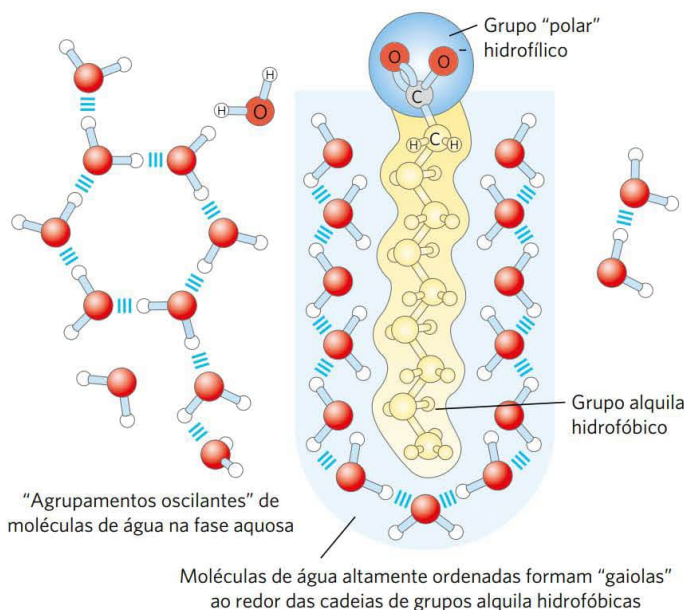
Quando a água é misturada com benzeno ou hexano, são formadas duas fases; nenhum dos líquidos é solúvel no outro. Compostos apolares como benzeno e hexano são hidrofóbicos – incapazes de fazer interações energeticamente favoráveis com moléculas de água, podendo interferir com as ligações de hidrogênio entre as moléculas de água. Todas as moléculas ou íons em solução aquosa interferem com as ligações de hidrogênio de algumas moléculas de água das suas vizinhanças, mas solutos polares ou carregados (como NaCl)

TABELA 2-3 Solubilidade de alguns gases na água

Gás	Estrutura ^a	Polaridade	Solubilidade em água (g/L) ^b
Nitrogênio	$\text{N}\equiv\text{N}$	Apolar	0,018 (40°C)
Oxigênio	$\text{O}=\text{O}$	Apolar	0,035 (50°C)
Dióxido de carbono	$\begin{array}{c} \delta^- \quad \delta^- \\ \leftarrow \quad \rightarrow \\ \text{O}=\text{C}=\text{O} \end{array}$	Apolar	0,97 (45°C)
Amônia	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \\ \diagdown \quad \quad \diagup \\ \text{N} \\ \downarrow \delta^- \end{array}$	Polar	900 (10°C)
Sulfeto de hidrogênio	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{S} \\ \downarrow \delta^- \end{array}$	Polar	1.860 (40°C)

^aAs setas representam dipolos elétricos; há uma carga negativa parcial (δ^-) na ponta da seta e uma carga positiva parcial (δ^+ ; não mostrada) na cauda da seta.

^bObserve que as moléculas polares dissolvem melhor, mesmo em temperaturas baixas, do que as moléculas apolares em temperaturas relativamente altas.

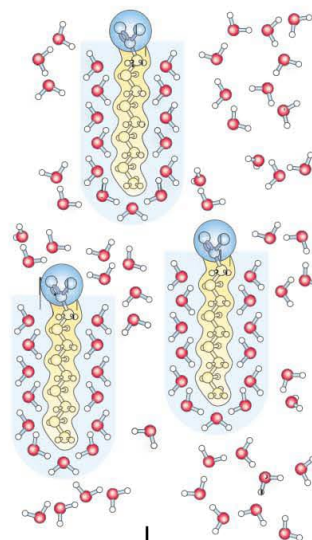


(a)

FIGURA 2-7 Compostos anfipáticos em solução aquosa. (a) Ácidos graxos de cadeia longa têm cadeias de grupos alquila muito hidrofóbicas, cada uma envolta por uma camada de moléculas de água altamente ordenadas. (b) Pela aglomeração conjunta em micelas, as moléculas de ácidos graxos expõem a menor área superficial possível para a água, e menos moléculas de água serão necessárias na camada de água ordenada. A energia ganha pela liberação das moléculas de água até então imobilizadas estabiliza a micela.

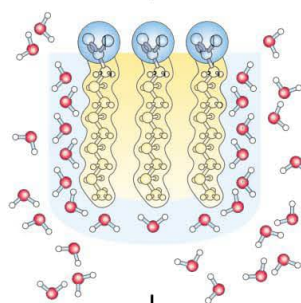
compensam as ligações de hidrogênio água-água perdidas pela formação de novas interações água-soluto. A variação líquida em entalpia (ΔH) para a dissolução desses solutos geralmente é pequena. Solutos hidrofóbicos, entretanto, não oferecem essa compensação, e sua adição à água pode resultar em um pequeno ganho de entalpia; a quebra das ligações de hidrogênio entre as moléculas de água retira energia do sistema, o que requer entrada de energia das vizinhanças. Além da entrada da energia necessária, a dissolução dos compostos hidrofóbicos em água produz um decréscimo mensurável na entropia. As moléculas de água na vizinhança imediata de um soluto apolar são restringidas no que se refere às orientações possíveis, já que formam um envoltório altamente ordenado na forma de uma camada ao redor de cada molécula do soluto. Essas moléculas de água não estão altamente orientadas como aquelas em **clatratos**, compostos cristalinos de solutos apolares e água, mas o efeito é o mesmo em ambos os casos: o ordenamento das moléculas de água reduz a entropia. O número de moléculas de água ordenadas e, portanto, a magnitude da redução da entropia são proporcionais à área da superfície do soluto hidrofóbico retido dentro da camada de moléculas de água que o envolve. A variação de energia livre para a dissolução de um soluto apolar é, portanto, desfavorável: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, em que ΔH tem um valor positivo, ΔS um valor negativo e ΔG é positivo.

Compostos **anfipáticos** contêm regiões polares (ou carregadas) e regiões apolares (Tabela 2-2). Quando um composto anfipático é misturado com água, a região polar



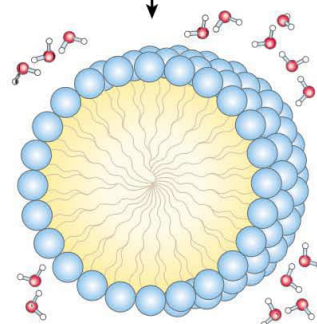
Dispersão de lipídeos em água

As moléculas de lipídeo forçam as moléculas de água circundantes a se tornarem altamente ordenadas.



Agglomerados de moléculas lipídicas

Somente as porções lipídicas das extremidades do aglomerado forçam o ordenamento das moléculas de água. Menos moléculas de água são ordenadas, e a entropia aumenta.



Micelas

Todos os grupos hidrofóbicos são afastados da água; a superfície ordenada de moléculas de água é minimizada, e a entropia aumenta ainda mais.

(b)

hidrofílica interage favoravelmente com a água e tende a se dissolver, mas a região apolar hidrofóbica tende a evitar contato com a água (**Figura 2-7a**). As regiões apolares das moléculas aglomeram-se para expor a menor área hidrofóbica possível ao solvente aquoso, e as regiões polares são arranjadas de forma a maximizar as interações com o solvente (**Figura 2-7b**). Esse fenômeno é chamado de **efeito hidrofóbico**. Essas estruturas estáveis de compostos anfipáticos em água, chamadas de **micelas**, podem conter centenas ou milhares de moléculas. As forças que mantêm regiões não polares juntas são, algumas vezes, denominadas

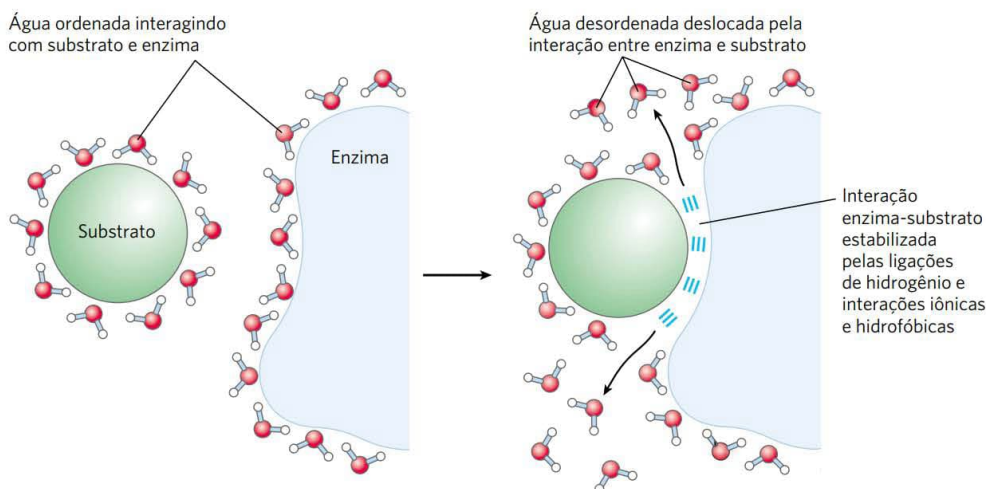


FIGURA 2-8 O desprendimento da água ordenada favorece a formação de complexos enzima-substrato. A enzima e o substrato, quando separados, forçam as moléculas de água vizinhas a formar uma camada ordenada. A ligação do substrato com a enzima libera algumas dessas águas ordenadas, e o aumento resultante na entropia favorece termodinamicamente a formação do complexo enzima-substrato (ver p. 196).

interações hidrofóbicas, embora essa terminologia possa causar confusão porque a força das interações não é causada por qualquer atração intrínseca entre regiões apolares. Em parte, isso é o resultado da maior estabilidade termodinâmica que o sistema atinge pela minimização do número de moléculas de água necessárias para envolver as porções hidrofóbicas das moléculas de soluto.

Muitas biomoléculas são anfipáticas; proteínas, pigmentos, certas vitaminas e esteroides e fosfolípidos de membranas apresentam regiões polares e apolares. As estruturas formadas por essas moléculas são estabilizadas por interações hidrofóbicas entre as regiões apolares. As interações hidrofóbicas entre os lípidos, e entre lípidos e proteínas, são as mais importantes para determinar a estrutura de membranas biológicas. A agregação de aminoácidos apolares no interior de proteínas, impulsionada pelo efeito hidrofóbico, também estabiliza a estrutura tridimensional das proteínas.

As ligações de hidrogênio entre a água e os solutos polares também causam um ordenamento das moléculas de água, mas o efeito energético é menos significativo que com solutos apolares. A ruptura do ordenamento de moléculas de água faz parte da força motriz da ligação de um substrato polar (reagente) a uma superfície polar complementar de uma enzima: a entropia aumenta quando a enzima desloca moléculas de água ordenadas do substrato, e o substrato desloca moléculas de água ordenadas da superfície da enzima (**Figura 2-8**).

Forças de van der Waals são atrações interatômicas fracas

Quando dois átomos não carregados são colocados bem próximos um do outro, as suas nuvens eletrônicas influenciam uma a outra. Variações aleatórias nas posições dos elétrons ao redor do núcleo podem criar um dipolo elétrico transitório, que induz a formação de um dipolo transitente de carga oposta no átomo que está mais próximo. Os dois dipolos atraem-se fracamente, aproximando os dois núcleos. Essas atrações fracas são chamadas de **forças de van der Waals**

(também conhecidas como forças de London). À medida que os dois núcleos se aproximam, as nuvens eletrônicas começam a repelir uma a outra. Nesse ponto, no qual a atração líquida é máxima, diz-se que o núcleo está em contato de van der Waals. Cada átomo tem um **raio de van der Waals** característico, uma medida do quão próximo um átomo permite que outro se aproxime (Tabela 2-4). No caso dos modelos moleculares de volume atômico mostrados neste livro, os átomos estão representados em tamanhos proporcionais aos seus raios de van der Waals.

TABELA 2-4 Raios de van der Waals e raios covalentes (ligação simples) de alguns elementos

Elementos	Raio de van der Waals (nm)	Raio covalente para ligações simples (nm)
H	0,11	0,030
O	0,15	0,066
N	0,15	0,070
C	0,17	0,077
S	0,18	0,104
P	0,19	0,110
I	0,21	0,133

Fontes: Para raios de van der Waals, R. Chauvin, *J. Phys. Chem.* 96:9194, 1992. Para raios covalentes, L. Pauling, *Nature of the Chemical Bond*, 3ª ed., Cornell University Press, 1960.

Nota: os raios de van der Waals descrevem as dimensões dos átomos no espaço. Quando dois átomos estão ligados covalentemente, os raios atômicos no ponto da ligação são menores que os raios de van der Waals, uma vez que os átomos unidos são aproximados pelo par de elétrons compartilhados. A distância entre os núcleos em uma força de van der Waals ou uma ligação covalente é aproximadamente igual à soma dos raios de van der Waals ou dos raios covalentes, respectivamente, para os dois átomos. Portanto, o comprimento de uma ligação carbono-carbono simples é de cerca de $0,077 \text{ nm} + 0,077 \text{ nm} = 0,154 \text{ nm}$.

Interações fracas são cruciais para a estrutura e a função das macromoléculas

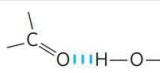
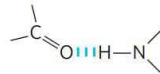


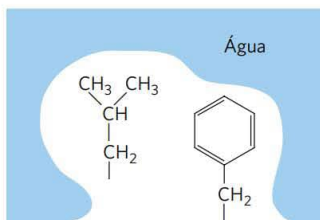
“À medida que os métodos da química estrutural forem aplicados em problemas fisiológicos, acredito, será descoberto que a importância das ligações de hidrogênio para a fisiologia é maior do que qualquer outra característica estrutural.”

—Linus Pauling,

The Nature of the Chemical Bond, 1939

As interações não covalentes descritas – ligações de hidrogênio e interações iônicas, hidrofóbicas e de van der Waals (Tabela 2-5) – são muito mais fracas do que as ligações covalentes. É necessário o fornecimento de 350 kJ de energia para quebrar um mol (6×10^{23}) de ligações simples do tipo C—C, e cerca de 410 kJ de energia para quebrar um mol de ligações C—H, porém uma quantidade pequena como 4 kJ é suficiente para romper um mol de interações típicas de van der Waals. As interações hidrofóbicas são também muito mais fracas que as ligações covalentes, embora elas sejam substancialmente fortalecidas por um solvente altamente polar (p. ex., solução salina concentrada). Interações iônicas e ligações de hidrogênio variam em intensidade, dependendo da polaridade do solvente e do alinhamento dos átomos ligados ao hidrogênio, mas são sempre muito mais fracas que as ligações covalentes. Em solvente aquoso a 25°C, a energia térmica disponível pode ser da mesma ordem de grandeza que a força dessas interações fracas, e as interações entre as moléculas de soluto e solvente (água) são quase tão favoráveis quanto as interações soluto-soluto.

TABELA 2-5 Os quatro tipos de interações não covalentes (“fracas”) entre biomoléculas em solvente aquoso

Ligações de hidrogênio Entre grupos neutros	
Entre ligações peptídicas	
Interações iônicas Atração	
Repulsão	
Interações hidrofóbicas	
Forças de van der Waals	Dois átomos quaisquer bem próximos um do outro

Consequentemente, ligações de hidrogênio e interações iônicas, hidrofóbicas e de van der Waals estão continuamente se formando e se desfazendo.

Apesar de esses quatro tipos de interações serem individualmente fracos em comparação com as ligações covalentes, o efeito cumulativo de muitas interações desse tipo pode ser muito significativo. Por exemplo, a ligação não covalente de uma enzima a um substrato pode envolver muitas ligações de hidrogênio e uma ou mais interações iônicas, assim como interações hidrofóbicas e de van der Waals. A formação de cada uma dessas ligações fracas contribui para um decréscimo na energia livre do sistema. É possível calcular a estabilidade de uma interação não covalente, como a da ligação de hidrogênio de uma molécula pequena com uma macromolécula, a partir da energia de ligação, que corresponde à redução na energia do sistema quando ocorre a ligação. A estabilidade, medida pela constante de equilíbrio da reação da ligação (ver a seguir), varia *exponencialmente* com a energia de ligação. Para dissociar duas biomoléculas (como enzima e substrato) que estejam associadas de forma não covalente por meio de múltiplas interações fracas, todas essas interações devem ser rompidas ao mesmo tempo. Devido ao fato de as interações flutuarem aleatoriamente, essas rupturas simultâneas são muito improváveis. Portanto, 5 ou 20 interações fracas dão uma estabilidade molecular muito maior em relação ao que seria de esperar intuitivamente a partir de uma simples soma de todas as pequenas energias de ligação.

Macromoléculas como proteínas, DNA e RNA contêm tantos sítios potenciais para ligações de hidrogênio ou interações iônicas, de van der Waals e hidrofóbicas que os efeitos cumulativos dessas pequenas forças de ligação podem ser enormes. Para macromoléculas, a estrutura mais estável (i.e., a nativa) em geral é aquela na qual as interações fracas estão maximizadas. O enovelamento de um único polipeptídeo ou uma cadeia polinucleotídica em sua forma tridimensional é determinado por esse princípio. A ligação de um antígeno a um anticorpo específico depende dos efeitos cumulativos de muitas interações fracas. Como observado anteriormente, a energia liberada quando uma enzima se liga não covalentemente ao seu substrato é a principal fonte do poder catalítico da enzima. A ligação de um hormônio ou um neurotransmissor ao seu receptor proteico celular é o resultado de múltiplas interações fracas. Uma consequência do grande tamanho de enzimas e receptores (em relação aos substratos e ligantes) é que suas grandes superfícies geram muitas possibilidades para a formação de interações fracas. No nível molecular, a complementaridade da interação entre as biomoléculas reflete a complementaridade e as forças de natureza fraca entre grupos polares, carregados e hidrofóbicos na superfície das moléculas.

Quando a estrutura de uma proteína como a hemoglobina (**Figura 2-9**) é determinada por cristalografia (ver Quadro 4-5), frequentemente são encontradas moléculas de água ligadas tão fortemente que fazem parte da estrutura do cristal; o mesmo é verdadeiro para a água presente em cristais de RNA ou DNA. Essas moléculas de água ligadas, que podem também ser detectadas em soluções aquosas por ressonância magnética nuclear, têm propriedades

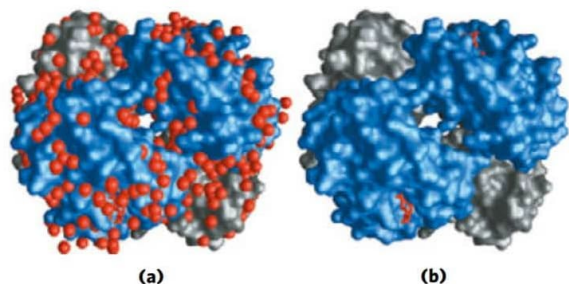


FIGURA 2-9 Ligação da água na hemoglobina. Estrutura cristalina da hemoglobina, mostrada com moléculas de água em (a) (esferas vermelhas) e sem moléculas de água (b). As moléculas de água estão ligadas tão firmemente que afetam o padrão de difração de raios X, apesar de serem partes fixas do cristal. As duas subunidades α da hemoglobina estão mostradas em cinza, e as duas subunidades β , em azul. Cada subunidade tem um grupo heme ligado (estrutura em bastão vermelho), visível somente nas subunidades β nesta figura. A estrutura e a função da hemoglobina estão discutidas em detalhes no Capítulo 5. [Fonte: PDB ID 1A3N, J. R. H. Tame e B. Vallone, *Acta Crystallogr. D* 56:805, 2000.]

bem diferentes daquelas das moléculas de água na massa do solvente. Elas não são, por exemplo, osmoticamente ativas (ver a seguir). Para muitas proteínas, a presença de moléculas de água fortemente ligadas é essencial para a função. Na reação-chave da fotossíntese, por exemplo, há um fluxo de prótons através de uma membrana biológica à medida que a luz impulsiona um fluxo de elétrons por uma série de proteínas transportadoras de elétrons (ver Figura 20-21). Uma dessas proteínas, o citocromo *f*, tem uma cadeia com cinco moléculas de água ligadas (**Figura 2-10**) que pode propiciar um caminho para os prótons se moverem através da membrana por um processo chamado de “salto de prótons” (descrito a seguir). Outra bomba de prótons impulsionada por luz, a bacteriorrodopsina, usa uma cadeia de moléculas de água precisamente orientadas para movimentar prótons através da membrana (Figura 20-29b). Moléculas de água fortemente ligadas também formam parte dos sítios de ligação de proteínas. Na proteína bacteriana que liga arabinose, por exemplo, cinco moléculas de água formam ligações de hidrogênio que fornecem ligações cruzadas cruciais entre o açúcar (arabinose) e os resíduos de aminoácido no local de ligação do açúcar (**Figura 2-11**).

Os solutos afetam as propriedades coligativas de soluções aquosas

Solutos de todos os tipos modificam algumas propriedades físicas do solvente, a água: a pressão de vapor, o ponto de ebulição e de fusão (ponto de congelamento) e a pressão osmótica. São chamadas de **propriedades coligativas** (“associadas”), porque o efeito de solutos sobre essas quatro propriedades tem base no mesmo princípio: a concentração da água é mais baixa nas soluções do que na água pura. O efeito da concentração do soluto nas propriedades coligativas da água é independente das propriedades químicas do soluto, dependendo somente do *número* de partículas de soluto (moléculas, íons) para uma dada quantidade de água. Por exemplo, um composto como o NaCl, que se

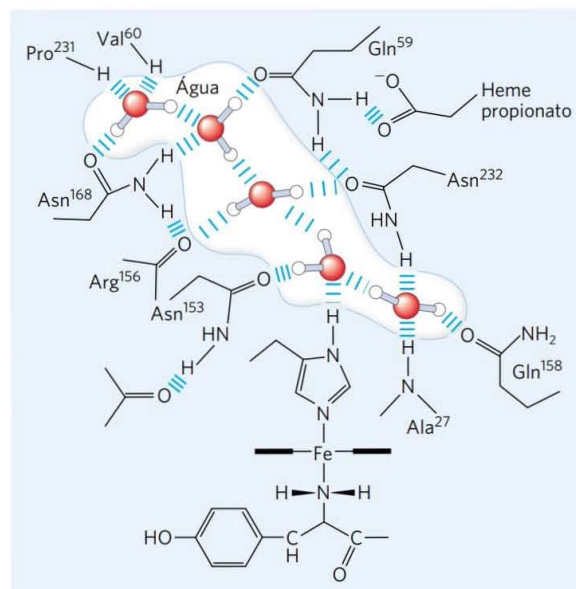


FIGURA 2-10 Cadeias de água no citocromo *f*. A água está ligada em um canal de prótons da proteína de membrana citocromo *f*, que é parte da maquinaria de fixação de energia da fotossíntese nos cloroplastos (ver Figura 20-21). Cinco moléculas de água estão unidas por ligações de hidrogênio umas às outras e a grupos funcionais da proteína: átomos da cadeia peptídica de resíduos de valina, prolina, arginina e alanina, e as cadeias laterais de três resíduos de asparagina e dois resíduos de glutamina. A proteína tem ligado um grupo heme (ver Figura 5-1), e o íon ferro desse grupo facilita o fluxo de elétrons durante a fotossíntese. O fluxo de elétrons é acoplado ao movimento de prótons pela membrana, o que provavelmente envolve “saltos de prótons” (ver Figura 2-14) através dessa cadeia de moléculas de água ligadas. [Fonte: informações de P. Nicholls, *Cell. Mol. Life Sci.* 57:987, 2000, Fig. 6a (redesenhada a partir de PDB ID 1HCZ, S. E. Martinez et al., *Prot. Sci.* 5:1081, 1996).]

dissocia em solução, tem efeito na pressão osmótica duas vezes maior que o número de moléculas de um soluto não dissociado como a glicose.

As moléculas de água tendem a se mover de uma região de maior concentração de água para uma de menor concentração, de acordo com a tendência natural de um sistema de se tornar mais desordenado. Quando duas soluções aquosas são separadas por uma membrana semipermeável (que permite a passagem de água, mas não de moléculas de soluto), a difusão das moléculas de água da região de maior concentração para a região de menor concentração de água produz pressão osmótica (**Figura 2-12**). A pressão osmótica, Π , medida como a força necessária para resistir ao movimento da água (Figura 2-12c), é aproximada pela equação de van't Hoff:

$$\Pi = icRT$$

na qual R é a constante dos gases e T é a temperatura absoluta. O símbolo i é o fator de van't Hoff, a medida de quanto de soluto se dissocia em duas ou mais espécies iônicas. O termo ic é a **osmolaridade** da solução, o produto do fator de van't Hoff i e a concentração molar do soluto c . Em soluções diluídas de NaCl, o soluto se dissocia completamente

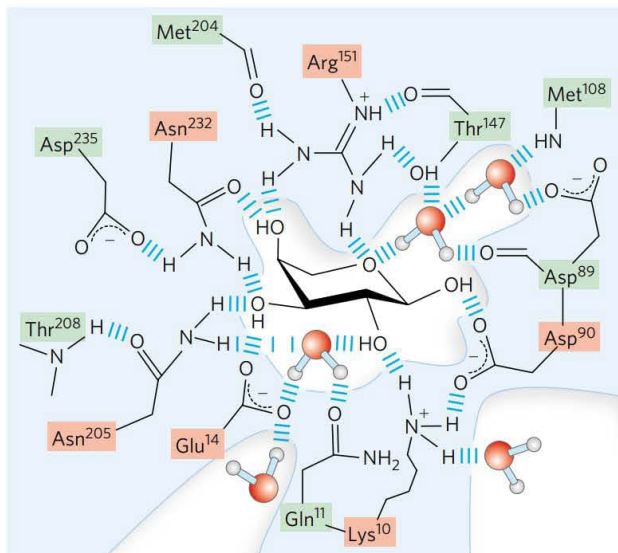


FIGURA 2-11 A água unida por ligação de hidrogênio faz parte do sítio de ligação de açúcar a uma proteína. Na proteína que liga L-arabinose da bactéria *E. coli*, cinco moléculas de água são componentes essenciais na rede de ligações de hidrogênio entre o açúcar arabinose (centro) e no mínimo 13 resíduos de aminoácidos no local de ligação do açúcar. Visto em três dimensões, esses três grupos de interações constituem duas camadas de semiconexões; resíduos de aminoácidos na primeira camada estão marcados em vermelho, na segunda camada, em verde. Algumas ligações de hidrogênio são desenhadas mais longas que outras para maior clareza; na verdade, elas não são mais longas que as outras. [Fonte: informações de P. Ball, *Chem. Rev.* 108:74, 2008, Fig. 16.]

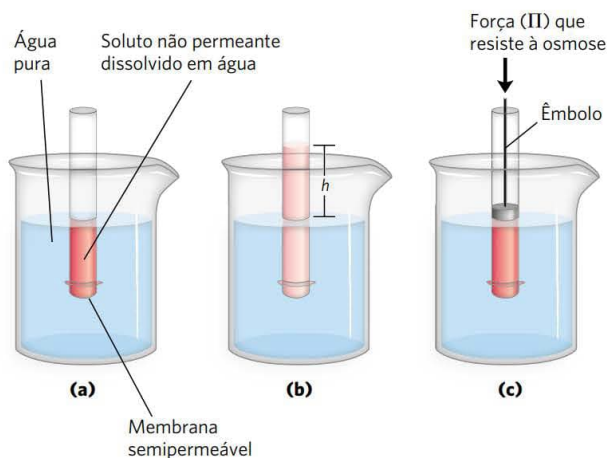


FIGURA 2-12 Osmose e a medida da pressão osmótica. (a) Estado inicial. O tubo contém uma solução aquosa, o bquer contém água pura e a membrana semipermeável permite a passagem de água, mas não de soluto. A água flui a partir do bquer para dentro do tubo para equalizar sua concentração dos dois lados da membrana. (b) Estado final. A água moveu-se para a solução do composto que não permeia através da membrana, diluiu-o e aumentou o nível de água na coluna dentro do tubo. No equilíbrio, a força da gravidade que atua sobre a solução do tubo equilibra a tendência da água de se mover para dentro do tubo, onde sua concentração é menor. (c) A pressão osmótica (Π) é medida como a força que deve ser aplicada para que a solução no tubo retorne ao nível que estava no bquer. Essa força é proporcional à altura, h , da coluna em (b).

em Na^+ e Cl^- , dobrando o número de partículas de soluto, sendo, portanto, $i = 2$. Para todos solutos não ionizáveis, $i = 1$. Para soluções com vários (n) solutos, Π é a soma da contribuição de cada espécie:

$$\Pi = RT (i_1 c_1 + i_2 c_2 + \dots + i_n c_n)$$

Osmose, o movimento da água através de uma membrana semipermeável ocasionado por diferenças na pressão osmótica, é um fator importante na vida de grande parte das células. As membranas plasmáticas são mais permeáveis à água que a maioria das outras moléculas pequenas, íons e macromoléculas, uma vez que os canais proteicos (aquaporinas; ver Figura 11-43) na membrana permitem a passagem de água seletivamente. Soluções com osmolaridade igual à do citosol de uma célula são ditas **isotônicas** em relação àquela célula. Circundada por uma solução isotônica, uma célula nunca ganha ou perde água (**Figura 2-13**). Em soluções **hipertônicas** (com maior osmolaridade que o citosol), a célula encolhe assim que água se transfere para fora. Em soluções **hipotônicas** (com menor osmolaridade que o citosol), a célula incha assim que a água entra. Em seus ambientes naturais, as células geralmente contêm maior concentração de biomoléculas e íons que as vizinhanças, logo, a pressão osmótica tende a enviar a água para dentro das células. Se não for contrabalançada de alguma maneira, essa invasão de água para dentro das células pode distender

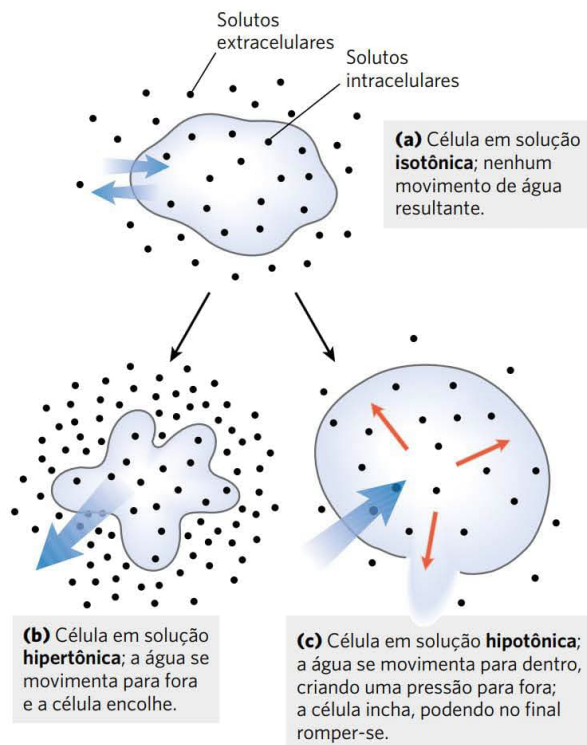


FIGURA 2-13 Efeito da osmolaridade extracelular no movimento da água através de uma membrana plasmática. Quando uma célula em balanço osmótico com o meio circundante – isto é, uma célula em (a) um meio isotônico – é transferida para (b) uma solução hipertônica ou (c) para uma solução hipotônica, a água tende a se mover através da membrana na direção que deve igualar a osmolaridade nos lados externo e interno da célula.

a membrana plasmática e, por fim, causar o rompimento da célula (osmólise).

Muitos mecanismos participam na prevenção dessa catástrofe. Em bactérias e plantas, a membrana plasmática é envolvida por uma parede celular não expansível com rigidez e força suficientes para resistir à pressão osmótica e impedir a osmólise. Alguns protistas de água doce que vivem em meio altamente hipotônico têm uma organela (vacúolo contrátil) que bombeia a água para fora da célula. Em animais multicelulares, o plasma sanguíneo e os fluidos intersticiais (o líquido extracelular dos tecidos) são mantidos em osmolaridade semelhante à do citosol. A alta concentração de albumina e outras proteínas no plasma sanguíneo contribuem para a sua osmolaridade. As células também bombeiam ativamente Na^+ e outros íons para o líquido intersticial para que o equilíbrio osmótico com o meio circundante seja mantido.

Como o efeito dos solutos na osmolaridade depende do número de partículas dissolvidas, e não da sua massa, as macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos) têm efeito muito menor na osmolaridade de uma solução com massa equivalente à soma dos seus componentes monoméricos. Por exemplo, um grama de um polissacarídeo composto por 1.000 unidades de glicose tem o mesmo efeito na osmolaridade que um miligrama de glicose. O armazenamento de energia na forma de polissacarídeos (amido ou glicogênio) em vez de glicose ou outros açúcares simples evita um grande aumento na pressão osmótica nas células de armazenamento.

As plantas usam a pressão osmótica para ter rigidez mecânica. A alta concentração de soluto nos vacúolos das células vegetais arrasta água para dentro das células (Figura 2-13), mas a parede celular não é expansível e evita o inchamento; em vez disso, a pressão exercida contra a parede celular (pressão de turgor) aumenta, enrijecendo a célula, o tecido e o corpo da planta. A alface da salada murcha devido à perda de água que reduziu a pressão de turgor. A osmólise também traz consequências para os protocolos de trabalho no laboratório. Mitocôndrias, cloroplastos e lisossomos, por exemplo, estão revestidos por membranas semipermeáveis. Ao isolar essas organelas a partir de células rompidas, os bioquímicos devem fazer os fracionamentos em soluções isotônicas (ver Figura 1-9) para evitar a entrada excessiva de água para dentro das organelas, o que pode causar inchamento e, por conseguinte, o rompimento. Os tampões usados em fracionamento geralmente contêm concentrações suficientes de sacarose ou algum outro soluto inerte para proteger as organelas da osmólise.

PROBLEMA 2-1 Força osmótica de uma organela I

Suponha que os principais solutos presentes nos lisossomos sejam KCl (~ 0,1 M) e NaCl (~ 0,03 M). Ao isolar os lisossomos, qual é a concentração de sacarose que deve estar presente na solução externa em temperatura ambiente (25°C) para evitar o inchamento e a lise das organelas?

Solução: é preciso achar a concentração de sacarose que produz uma força osmótica igual à produzida pelos sais KCl e NaCl dentro dos lisossomos. A equação para calcular a força osmótica (a equação de van't Hoff) é:

$$\Pi = RT (i_1 c_1 + i_2 c_2 + i_3 c_3 + \dots + i_n c_n)$$

em que R é a constante dos gases 8,315 J/mol·K, T é a temperatura absoluta (em Kelvin), c_1 , c_2 e c_3 são as concentrações molares de cada soluto, e i_1 , i_2 e i_3 são o número de partículas de cada soluto presente na solução ($i = 2$ para KCl e NaCl).

A pressão osmótica do conteúdo do lisossomo é:

$$\begin{aligned}\Pi_{\text{lisossomo}} &= RT (i_{\text{KCl}} c_{\text{KCl}} + i_{\text{NaCl}} c_{\text{NaCl}}) \\ &= RT [(2)(0,1 \text{ mol/L}) + (2)(0,03 \text{ mol/L})] \\ &= RT (0,26 \text{ mol/L})\end{aligned}$$

A pressão osmótica de uma solução de sacarose é dada por:

$$\Pi_{\text{sacarose}} = RT (i_{\text{sacarose}} c_{\text{sacarose}})$$

Neste caso, $i_{\text{sacarose}} = 1$, porque a sacarose não se ioniza. Portanto,

$$\Pi_{\text{sacarose}} = RT (c_{\text{sacarose}})$$

A força osmótica do conteúdo do lisossomo é igual à da solução de sacarose quando:

$$\begin{aligned}\Pi_{\text{sacarose}} &= \Pi_{\text{lisossomo}} \\ RT(c_{\text{sacarose}}) &= RT (0,26 \text{ mol/L}) \\ c_{\text{sacarose}} &= 0,26 \text{ mol/L}\end{aligned}$$

Assim, a concentração necessária de sacarose (M_r 342) é (0,26 mol/L) (342 g/mol) = 88,92 g/L. Usando a precisão de um algoritmo significativo para a concentração do soluto, $c_{\text{sacarose}} = 0,09 \text{ kg/L}$.

PROBLEMA 2-2 Força osmótica de uma organela II

Suponha que se decida usar uma solução de um polissacarídeo, como o glicogênio (ver p. 254), para equilibrar a pressão osmótica dos lisossomos (descritos no Problema 2-1). Considerando um polímero linear de 100 unidades de glicose, calcule a quantidade desse polímero necessária para atingir a mesma pressão osmótica da solução de sacarose do Problema 2-1. A M_r do polímero de glicose é ~ 18.000 e, como a sacarose, não se ioniza em solução.

Solução: como derivado no Problema 2-1,

$$\Pi_{\text{sacarose}} = RT (0,26 \text{ mol/L})$$

Da mesma forma,

$$\Pi_{\text{glicogênio}} = RT (i_{\text{glicogênio}} c_{\text{glicogênio}}) = RT (c_{\text{glicogênio}})$$

Para uma solução de glicogênio com força osmótica igual à da solução de sacarose,

$$\begin{aligned}\Pi_{\text{glicogênio}} &= \Pi_{\text{sacarose}} \\ RT (c_{\text{glicogênio}}) &= RT (0,26 \text{ mol/L}) \\ c_{\text{glicogênio}} &= 0,26 \text{ mol/L} = (0,26 \text{ mol/L})(18.000 \text{ g/mol}) \\ &= 4,68 \text{ kg/L}\end{aligned}$$

Ou, considerando algoritmos significativos, $c_{\text{glicogênio}} = 5 \text{ kg/L}$, uma concentração absurdamente alta.

Como será visto mais adiante (p. 254), células do fígado e do músculo armazenam carboidratos não na forma de açúcares de baixa massa molecular, como glicose ou sacarose, mas na forma de glicogênio, polímero de alta massa molecular. Isso permite que a célula contenha uma quantidade maior de glicogênio com um efeito mínimo na osmolaridade do citosol.

RESUMO 2.1 Interações fracas em sistemas aquosos

- A diferença entre a eletronegatividade do H e a do O torna a água uma molécula muito polar, capaz de formar ligações de hidrogênio entre moléculas de água e entre moléculas de água e solutos. As ligações de hidrogênio são curtas, basicamente eletrostáticas e mais fracas que as ligações covalentes. A água é um bom solvente para solutos polares (hidrofílicos), com os quais forma ligações de hidrogênio, e para solutos carregados, com os quais forma interações eletrostáticas.
- Compostos apolares (hidrofóbicos) dissolvem-se fracamente em água; eles não formam ligações de hidrogênio com o solvente, e a sua presença força um ordenamento energeticamente desfavorável de moléculas de água nas suas superfícies hidrofóbicas. Para minimizar a superfície exposta à água, os compostos apolares como os lipídeos formam agregados (micelas), nos quais as porções hidrofóbicas são sequestradas no interior, associando-se por meio de interações hidrofóbicas, e somente a parte mais polar interage com a água.
- Interações fracas e não covalentes, em grande número, influenciam decisivamente o enovelamento de macromoléculas, como proteínas e ácidos nucleicos. As conformações mais estáveis são aquelas nas quais as ligações de hidrogênio são maximizadas dentro da molécula e entre a molécula e o solvente, e nas quais as partes hidrofóbicas se agregam no interior das moléculas, longe do solvente aquoso.
- As propriedades físicas das soluções aquosas são fortemente influenciadas pelas concentrações dos solutos. Quando dois compartimentos aquosos são separados por uma membrana semipermeável (como a membrana plasmática que separa uma célula do seu meio circundante), a água move-se através da membrana para igualar a osmolaridade nos dois compartimentos. Essa tendência da água de se mover através de uma membrana semipermeável produz a pressão osmótica.

2.2 Ionização da água e de ácidos e bases fracos

Embora muitas das propriedades da água como solvente possam ser explicadas em termos da molécula de água não carregada, o pequeno grau de ionização da água em íons (H^+) e (OH^-) deve também ser levado em consideração. Como todas as reações reversíveis, a ionização da água pode ser descrita por uma constante de equilíbrio. Quando os ácidos fracos são dissolvidos na água, eles contribuem com um H^+ por ionização; bases fracas consomem um H^+ , tornando-se protonadas. Esses processos também são governados

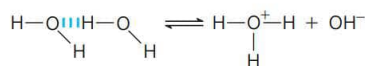
por constantes de equilíbrio. A concentração total dos íons hidrogênio a partir de todas as fontes é mensurável experimentalmente, sendo expressa como o pH da solução. Para prever o estado de ionização de solutos na água, deve-se considerar as constantes de equilíbrio relevantes para cada reação de ionização. Por isso, será feita uma breve discussão sobre a ionização da água e de ácidos e bases fracas dissolvidas em água.

A água pura é levemente ionizada

As moléculas de água têm a leve tendência de sofrer uma ionização reversível, produzindo um íon hidrogênio (próton) e um íon hidróxido, gerando o equilíbrio:



Apesar de geralmente se mostrar o produto de dissociação da água como H^+ , os prótons livres não existem em solução; os íons hidrogênio formados em água são imediatamente hidratados para formar **íons hidrônio** (H_3O^+). As ligações de hidrogênio entre as moléculas de água fazem a hidratação dos prótons dissociados ser praticamente instantânea:



A ionização da água pode ser medida pela sua condutividade elétrica; a água pura carrega corrente elétrica, enquanto o H_3O^+ migra para o cátodo, e o OH^- , para o ânodo. O movimento dos íons hidrônio e hidróxido no campo elétrico é extremamente rápido comparado com o de outros íons, como Na^+ , K^+ e Cl^- . Essa alta mobilidade iônica resulta do tipo de “salto de prótons” mostrado na **Figura 2-14**. Os prótons individuais não se movem para muito longe na solução, mas uma série de prótons salta entre as moléculas de água ligadas por hidrogênio e gera um movimento *líquido* de prótons por uma longa distância em um tempo extremamente curto. (OH^- também se move rapidamente por saltos, mas na direção oposta.) Como resultado da alta mobilidade iônica do H^+ , reações acidobásicas em soluções aquosas são excepcionalmente rápidas. Como observado anteriormente, o salto de prótons muito provavelmente exerce uma função nas reações biológicas de transferência de prótons (Figura 2-10; ver também Figura 20-29b).

Uma vez que a ionização reversível é crucial para o papel da água nas funções da célula, deve haver meios de expressar o grau de ionização da água em termos quantitativos. Uma breve revisão de algumas propriedades de reações químicas reversíveis mostra como isso pode ser feito.

A posição de equilíbrio de qualquer reação química é dada por sua **constante de equilíbrio**, K_{eq} (algumas vezes expressa simplesmente por K). Para a reação geral:



a constante de equilíbrio K_{eq} pode ser definida em termos da concentração dos reagentes (A e B) e dos produtos (C e D) no equilíbrio:

$$K_{eq} = \frac{[C]_{eq}[D]_{eq}}{[A]_{eq}[B]_{eq}}$$

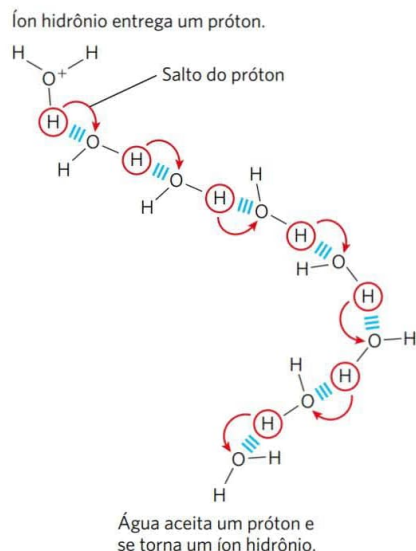


FIGURA 2-14 Salto de prótons. Pequenos “saltos” de prótons entre uma série de moléculas de água ligadas por hidrogênio resultam em um movimento líquido extremamente rápido de um próton em uma longa distância. Como o íon hidrônio (parte superior, à esquerda) doa um próton, uma molécula de água a certa distância (parte inferior, à direita) adquire um próton, tornando-se um íon hidrônio. O salto de prótons é muito mais rápido que a difusão verdadeira e explica a mobilidade iônica incrivelmente alta dos íons H^+ comparados com outros cátions monovalentes, como Na^+ e K^+ .

Estritamente falando, os termos de concentração devem ser expressos como *atividades*, ou concentrações efetivas em soluções não ideais, de cada espécie. Exceto em trabalhos muito precisos, entretanto, a constante de equilíbrio pode ser aproximada pela medida das *concentrações* no equilíbrio. Por razões que vão além do escopo desta discussão, as constantes de equilíbrio são adimensionais. Apesar disso, o texto continuará a utilizar as unidades de concentração (M) nas expressões da constante de equilíbrio usadas neste livro para lembrá-los de que a molaridade é a unidade de concentração usada para o cálculo de K_{eq} .

A constante de equilíbrio é constante e característica para qualquer reação química em uma temperatura específica. Ela define a composição final da mistura no equilíbrio, independentemente das concentrações iniciais dos reagentes e dos produtos. Inversamente, é possível calcular a constante de equilíbrio para uma dada reação em uma dada temperatura, se forem conhecidas as concentrações de equilíbrio de todos os reagentes e produtos. Como mostrado no Capítulo 1 (p. 26), a variação de energia livre padrão (ΔG°) é diretamente relacionada ao $\ln K_{eq}$.

A ionização da água é expressa pela constante de equilíbrio

O grau de ionização da água no equilíbrio (Equação 2-1) é baixo; a 25°C somente duas entre 10^9 moléculas na água pura são ionizadas a cada momento. A constante de equilíbrio para a ionização reversível da água é:

$$K_{eq} = \frac{[H^+][OH^-]}{[H_2O]} \quad (2-3)$$

Na água pura a 25°C, a concentração de água é 55,5 M – gramas de H_2O em 1 L divididas pela sua massa molecular em grama: $(1.000 \text{ g/L})/(18,015 \text{ g/mol})$ –, praticamente constante em relação à concentração muito baixa de H^+ e OH^- , especificamente 1×10^{-7} M. Assim, substituindo-se 55,5 M na equação da constante do equilíbrio (Equação 2-3) obtém-se

$$K_{eq} = \frac{[H^+][OH^-]}{[55,5 \text{ M}]}$$

Rearranjando, isso se torna:

$$(55,5 \text{ M})(K_{eq}) = [H^+][OH^-] = K_w \quad (2-4)$$

em que K_w designa o produto $(55,5 \text{ M})(K_{eq})$, que é o **produto iônico da água a 25°C**.

O valor de K_{eq} , determinado por medidas da condutividade elétrica da água pura é $1,8 \times 10^{-16} \text{ M}$ a 25°C. Substituindo esse valor por K_{eq} na Equação 2-4 obtém-se o valor do produto iônico da água:

$$\begin{aligned} K_w &= [H^+][OH^-] = (55,5 \text{ M})(1,8 \times 10^{-16} \text{ M}) \\ &= 1,0 \times 10^{-14} \text{ M}^2 \end{aligned}$$

Assim, o produto $[H^+][OH^-]$ em solução aquosa a 25°C é sempre igual a $1 \times 10^{-14} \text{ M}^2$. Quando existem concentrações iguais de H^+ e de OH^- , como na água pura, diz-se que a solução está em **pH neutro**. Nesse pH, a concentração de H^+ e de OH^- pode ser calculada a partir do produto iônico da água como segue:

$$K_w = [H^+][OH^-] = [H^+]^2 = [OH^-]^2$$

Resolvendo para $[H^+]$ tem-se:

$$\begin{aligned} [H^+] &= \sqrt{K_w} = \sqrt{1 \times 10^{-14} \text{ M}^2} \\ [H^+] &= [OH^-] = 10^{-7} \text{ M} \end{aligned}$$

Como o produto iônico da água é constante, quando $[H^+]$ é maior que $1 \times 10^{-7} \text{ M}$, a concentração de $[OH^-]$ deve ser menor que $1 \times 10^{-7} \text{ M}$, e vice-versa. Quando a concentração de $[H^+]$ é muito alta, como na solução de ácido clorídrico, a concentração de $[OH^-]$ deve ser bem baixa. A partir do produto iônico da água, pode-se calcular $[H^+]$ se a concentração de $[OH^-]$ for conhecida, e vice-versa.

PROBLEMA 2-3 Cálculo de $[H^+]$

Qual é a concentração de H^+ em uma solução de 0,1 M de NaOH?

Solução: começa-se com a equação do produto iônico da água:

$$K_w = [H^+][OH^-]$$

Partindo de $[OH^-] = 0,1 \text{ M}$, resolvendo-se para $[H^+]$ obtém-se:

$$\begin{aligned} [H^+] &= \frac{K_w}{[OH^-]} = \frac{1 \times 10^{-14} \text{ M}^2}{0,1 \text{ M}} = \frac{10^{-14} \text{ M}^2}{10^{-1} \text{ M}} \\ &= 10^{-13} \text{ M} \end{aligned}$$

PROBLEMA 2-4 Cálculo de $[\text{OH}^-]$

Qual é a concentração de OH^- em uma solução com uma concentração de $1,3 \times 10^{-4} \text{ M}$?

Solução: começa-se com a equação do produto iônico da água:

$$K_w = [\text{H}^+][\text{OH}^-]$$

Com $[\text{H}^+] = 1,3 \times 10^{-4} \text{ M}$, resolvendo para a $[\text{OH}^-]$ tem-se:

$$[\text{OH}^-] = \frac{K_w}{[\text{H}^+]} = \frac{1 \times 10^{-14} \text{ M}^2}{0,00013 \text{ M}} = \frac{10^{-14} \text{ M}^2}{1,3 \times 10^{-4} \text{ M}} \\ = 7,7 \times 10^{-11} \text{ M}$$

Em todos os cálculos, deve-se ter o cuidado de arredondar a resposta para o número correto de algarismos significativos, como acima.

A escala de pH indica as concentrações de H^+ e OH^-

O produto iônico da água, K_w , é base da **escala de pH** (Tabela 2-6). É um meio conveniente de designar a concentração de H^+ (e, portanto, de OH^-) em qualquer solução aquosa no intervalo entre $1,0 \text{ M H}^+$ e $1,0 \text{ M OH}^-$. O termo **pH** é definido pela expressão

$$\text{pH} = \log \frac{1}{[\text{H}^+]} = -\log [\text{H}^+]$$

TABELA 2-6 A escala de pH

$[\text{H}^+] \text{ (M)}$	pH	$[\text{OH}^-] \text{ (M)}$	pOH ^a
10^0 (1)	0	10^{-14}	14
10^{-1}	1	10^{-13}	13
10^{-2}	2	10^{-12}	12
10^{-3}	3	10^{-11}	11
10^{-4}	4	10^{-10}	10
10^{-5}	5	10^{-9}	9
10^{-6}	6	10^{-8}	8
10^{-7}	7	10^{-7}	7
10^{-8}	8	10^{-6}	6
10^{-9}	9	10^{-5}	5
10^{-10}	10	10^{-4}	4
10^{-11}	11	10^{-3}	3
10^{-12}	12	10^{-2}	2
10^{-13}	13	10^{-1}	1
10^{-14}	14	10^0 (1)	0

^aA expressão pOH é algumas vezes usada para descrever a alcalinidade, ou concentração, de OH^- de uma solução; o pOH é definido pela expressão $\text{pOH} = -\log [\text{OH}^-]$, que é análoga à expressão para o pH. Observe que em todos os casos $\text{pH} + \text{pOH} = 14$.

O símbolo p denota “logaritmo negativo de”. Para uma solução neutra a 25°C , na qual a concentração de íons hidrogênio é exatamente $1,0 \times 10^{-7} \text{ M}$, o pH pode ser calculado como se segue:

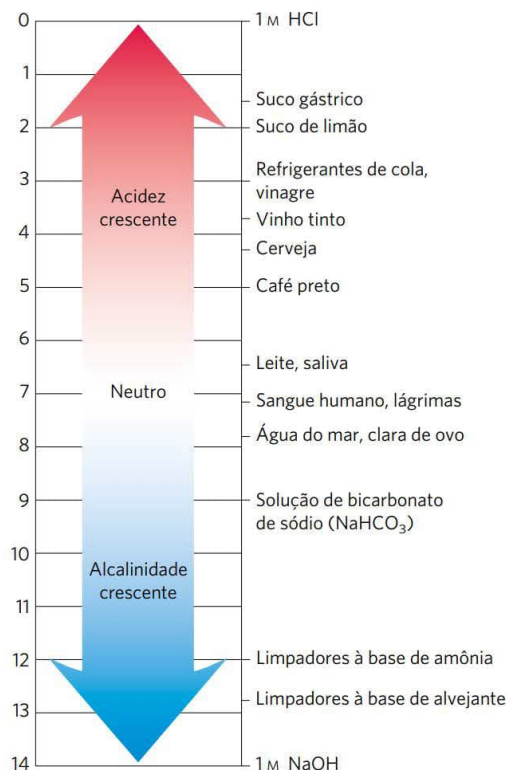
$$\text{pH} = \log \frac{1}{1,0 \times 10^{-7}} = 7,0$$

Observe que a concentração de H^+ deve ser expressa em termos molares (M).

O valor de 7 para o pH de uma solução neutra não é um número escolhido arbitrariamente, sendo derivado do valor absoluto do produto iônico da água a 25°C , que, por uma coincidência conveniente, é um valor inteiro. Soluções com pH maior que 7 são alcalinas ou básicas; nesta situação, a concentração de OH^- é maior que a de H^+ . Inversamente, soluções tendo pH menor que 7 são ácidas.

Lembre-se que a escala de pH é logarítmica, e não aritmética. Se duas soluções diferem em pH por uma (1) unidade, isso significa que uma solução tem dez vezes mais a concentração de íons H^+ que a outra, mas não indica a magnitude absoluta da diferença. A **Figura 2-15** fornece os valores de pH de alguns fluidos aquosos. Um refrigerante de sabor cola (pH 3,0) ou um vinho tinto (pH 3,7) têm uma concentração de íons H^+ de aproximadamente 10.000 vezes a do sangue (pH 7,4).

O pH de uma solução aquosa pode ser medido por aproximação usando vários tipos de indicadores coloridos, incluindo tornassol, fenolftaleína e vermelho de fenol. Essas substâncias passam por uma mudança de cor quando um

**FIGURA 2-15** O pH de alguns fluidos aquosos.

próton se dissocia da molécula. Determinações precisas do pH em laboratórios químicos ou clínicos são feitas com um eletrodo de vidro que é seletivamente sensível à concentração dos íons H^+ , mas insensível a Na^+ , K^+ e outros cátions. Em um pH-metro, o sinal do eletrodo de vidro colocado em uma solução de teste é amplificado e comparado com o sinal gerado por uma solução de pH conhecido.



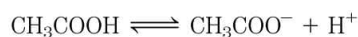
Medir o pH é um dos procedimentos mais importantes e usados com mais frequência na bioquímica. O pH afeta a estrutura e a atividade de macromoléculas biológicas; por exemplo, a atividade catalítica das enzimas é extremamente dependente do pH (ver Figura 2-22). As medidas do pH do sangue e da urina são comumente usadas para o diagnóstico médico. O pH do plasma sanguíneo das pessoas com diabetes grave e não controlado é comumente abaixo do valor normal de 7,4; essa condição é chamada de **acidose** (descrita com maior detalhes a seguir). Em algumas outras doenças, o pH sanguíneo é mais alto que o normal, uma condição conhecida como **alcalose**. A acidose ou a alcalose extremas trazem risco de vida. ■

Ácidos e bases fracos têm constantes de dissociação ácidas características

Os ácidos clorídrico, sulfúrico e nítrico, comumente chamados de ácidos fortes, são completamente ionizados em solu-

ções aquosas diluídas; as bases fortes NaOH e KOH também são completamente ionizadas. O que mais interessa aos bioquímicos é o comportamento de ácidos e bases não completamente ionizados quando dissolvidos em água. Eles estão presentes em sistemas biológicos e desempenham papéis importantes no metabolismo e na sua regulação. O comportamento de soluções aquosas de ácidos e bases fracas será mais bem compreendido definindo-se primeiramente alguns termos.

Os ácidos podem ser definidos como doadores de prótons e as bases comoceptoras de prótons. Quando um doador de prótons como o ácido acético (CH_3COOH) perde um próton, ele se torna o correspondente receptor de prótons, nesse caso o ânion acetato (CH_3COO^-). Um doador de prótons e seu correspondente receptor de prótons constituem um **par conjugado ácido-base** (Figura 2-16), conforme a reação reversível:



Cada ácido tem uma tendência característica de perder o próton quando estiver em uma solução aquosa, e quanto mais forte for o ácido, maior a tendência de perder o próton. A tendência de qualquer ácido (HA) de perder um próton e formar a base conjugada (A^-) é definida pela constante de equilíbrio (K_{eq}) para a reação reversível:

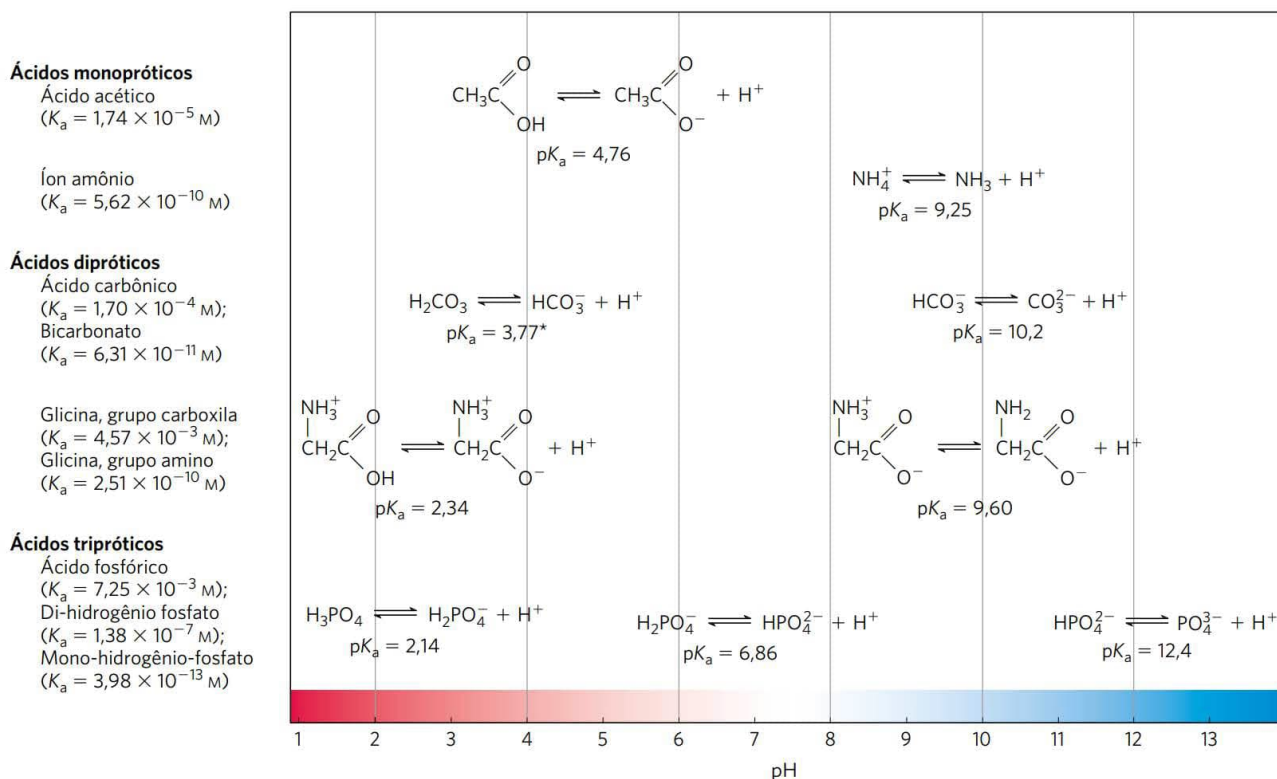
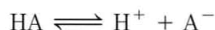


FIGURA 2-16 Pares conjugados ácido-base consistem em um doador de prótons e um receptor de prótons. Alguns compostos como o ácido acético e íons amônio são monoproticos; eles só podem doar um próton. Outros são diproticos (ácido carbônico e glicina) ou triproticos (ácido fosfórico). As reações de dissociação de cada par são mostradas onde elas ocorrem ao longo de um gradiente de pH. A constante de equilíbrio ou dissociação (K_a) e o seu logaritmo negativo, o pK_a , estão mostrados para cada reação. *Consulte a página 67 para uma explicação sobre as aparentes discrepâncias dos valores de pK_a do ácido carbônico (H_2CO_3).



para a qual

$$K_{\text{eq}} = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]} = K_a$$

As constantes de equilíbrio para as reações de ionização são comumente chamadas de **constantes de ionização** ou **constantes de dissociação ácidas**, frequentemente designadas por K_a . As constantes de dissociação de alguns ácidos estão apresentadas na Figura 2-16. Ácidos mais fortes, como os ácidos fosfórico e carbônico, têm constantes de ionização maiores; ácidos mais fracos, como o fosfato mono-hidrogenado (HPO_4^{2-}), têm constantes de ionização menores.

Apresentados na Figura 2-16 estão os valores de $\text{p}K_a$, que é análogo ao pH e é definido pela equação

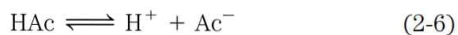
$$\text{p}K_a = \log \frac{1}{K_a} = -\log K_a$$

Quanto mais forte a tendência de dissociar um próton, mais forte será o ácido e mais baixo será o seu $\text{p}K_a$. Como será visto agora, o $\text{p}K_a$ de qualquer ácido fraco pode ser determinado facilmente.

Curvas de titulação revelam o $\text{p}K_a$ de ácidos fracos

A titulação é usada para determinar a quantidade de um ácido em determinada solução. Um dado volume do ácido é titulado com uma solução de base forte, geralmente hidróxido de sódio (NaOH), de concentração conhecida. O NaOH é adicionado em pequenos incrementos até o ácido ser consumido (neutralizado), o que é determinado com um indicador ou um pH-metro. A concentração do ácido na solução original pode ser calculada a partir do volume e da concentração de NaOH adicionado. A quantidade de ácido e base na titulação é comumente expressa em termo de equivalentes, em que um equivalente é a quantidade de substância que reagirá com, ou suprirá, um mol de íons de hidrogênio em uma reação ácido-básica.

Uma curva de valores de pH contra a quantidade de NaOH adicionada (uma **curva de titulação**) revela o $\text{p}K_a$ do ácido fraco. Considere a titulação de uma solução 0,1 M de ácido acético com 0,1 M de NaOH a 25°C (Figura 2-17). Duas reações reversíveis de equilíbrio estão envolvidas no processo (aqui, por simplicidade, o ácido acético será designado por HAc):



O equilíbrio deve ocorrer simultaneamente, obedecendo às características das constantes de equilíbrio, que são, respectivamente,

$$K_w = [\text{H}^+][\text{OH}^-] = 1 \times 10^{-14} \text{ M}^2 \quad (2-7)$$

$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{Ac}^-]}{[\text{HAc}]} = 1,74 \times 10^{-5} \text{ M} \quad (2-8)$$

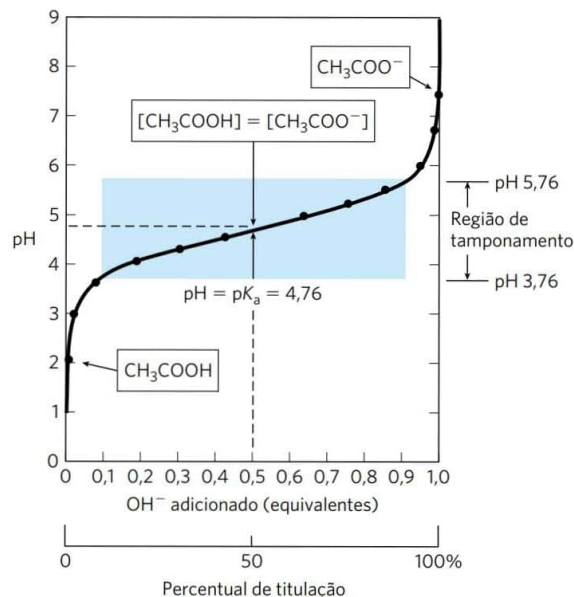


FIGURA 2-17 A curva de titulação do ácido acético. Depois da adição de cada incremento de NaOH à solução de ácido acético, o pH da mistura é medido. Esse valor é colocado em um gráfico em função da quantidade de NaOH adicionada, expresso como a fração da concentração total necessária para converter todo o ácido acético (CH_3COOH) na sua forma desprotonada, acetato (CH_3COO^-). Os pontos então obtidos geram a curva de titulação. Nos retângulos estão mostradas as formas iônicas predominantes nos pontos designados. No ponto central da titulação, as concentrações de doadores de prótons e aceptores de prótons são iguais, e o pH é numericamente igual ao $\text{p}K_a$. A zona sombreada é a região útil com poder tamponante, geralmente entre 10 e 90% da titulação de um ácido fraco.

No início da titulação, antes da adição de NaOH, o ácido acético já encontra-se parcialmente ionizado, em um valor que pode ser calculado a partir de sua constante de ionização (Equação 2-8).

À medida que NaOH for gradualmente sendo adicionado, o íon OH^- adicionado combina-se com os íons livres H^+ na solução para formar H_2O , em uma quantidade que satisfaz a relação de equilíbrio da Equação 2-7. Como os íons H^+ são removidos, o HAc dissocia-se um pouco mais para satisfazer a sua própria constante de equilíbrio (Equação 2-8). A titulação prossegue, de forma que uma maior quantidade de HAc ioniza, formando Ac^- , na medida em que o NaOH é adicionado. No ponto central da titulação, no qual exatos 0,5 equivalentes de NaOH foram adicionados por equivalente do ácido, metade do ácido acético original se dissociou, de forma que a concentração de doadores de prótons [HAc] agora é igual à do receptor de prótons [Ac^-]. Neste ponto central, uma relação muito importante é estabelecida: o pH da solução equimolar de ácido acético e de acetato é exatamente igual ao $\text{p}K_a$ do ácido acético ($\text{p}K_a = 4,76$; Figuras 2-16, 2-17). A base dessa relação, que é válida para todos os ácidos fracos, ficará clara em breve.

À medida que a titulação continua pela adição de mais NaOH, o ácido acético não dissociado remanescente é

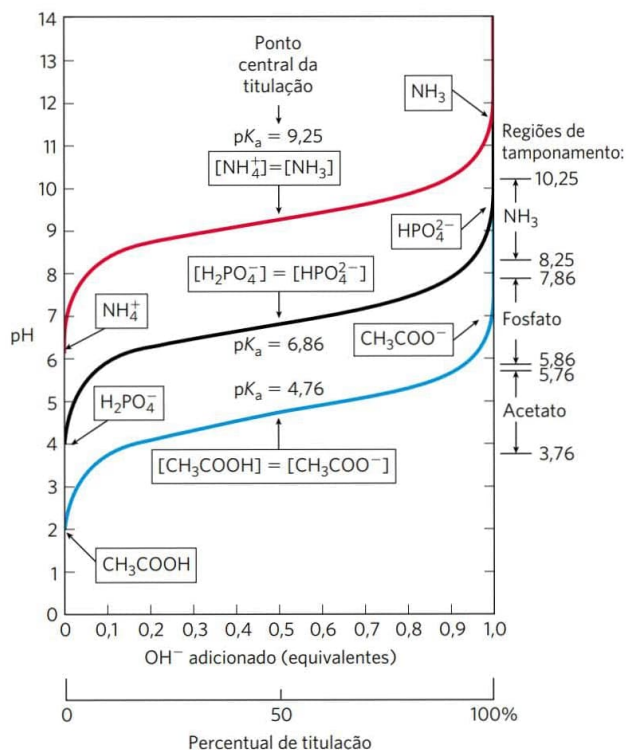


FIGURA 2-18 Comparação das curvas de titulação de três ácidos fracos. Aqui estão mostradas as curvas de titulação para CH_3COOH , H_2PO_4^- e NH_4^+ . As formas iônicas predominantes nos pontos designados da titulação estão destacadas nos retângulos. As regiões com capacidade tamponante estão indicadas à esquerda. Os pares conjugados ácido-base são tampões efetivos entre aproximadamente 10 e 90% da neutralização das espécies doadoras de prótons.

convertido em acetato. O ponto final da titulação ocorre em pH próximo de 7,0: todo o ácido acético perdeu seus prótons para os íons OH^- , para formar H_2O e acetato. Por meio da titulação, os dois equilíbrios (Equações 2-5, 2-6) coexistem, cada um obedecendo à sua constante de equilíbrio.

A **Figura 2-18** compara as curvas de titulação de três ácidos fracos com constantes de ionização bem diferentes: ácido acético ($\text{p}K_a = 4,76$); ácido fosfórico, H_2PO_4^- ($\text{p}K_a = 6,86$); e íon amônio, NH_4^+ ($\text{p}K_a = 9,25$). Embora as curvas de titulação desses ácidos tenham a mesma forma, elas são deslocadas ao longo do eixo do pH devido aos três ácidos possuírem diferentes forças. O ácido acético, com o maior K_a (menor $\text{p}K_a$) dos três, é o mais forte entre esses ácidos fracos (perde seu próton mais prontamente); ele já se encontra dissociado pela metade no pH 4,76. O di-hidrogênio-fosfato perde um próton menos prontamente, estando dissociado pela metade no pH 6,86. O íon amônio é o ácido mais fraco dos três, e só se encontra dissociado pela metade em pH 9,25.

A curva de titulação de um ácido fraco mostra graficamente que um ácido fraco e seu ânion – um par conjugado ácido-base – podem agir como um tampão, conforme será descrito na próxima seção.

RESUMO 2.2 Ionização da água e de ácidos e bases fracos

- A água pura se ioniza levemente, formando número igual de íons hidrogênio (íons hidrônio, H_3O^+) e íons hidróxido. A extensão da ionização é descrita pela constante de equilíbrio, $K_{\text{eq}} = \frac{[\text{H}^+][\text{OH}^-]}{[\text{H}_2\text{O}]}$, da qual resulta o produto iônico da água, K_w . A 25°C , $K_w = [\text{H}^+][\text{OH}^-] = (55,5 \text{ M})(K_{\text{eq}}) = 10^{-14} \text{ M}^2$.
- O pH de uma solução aquosa reflete, em escala logarítmica, a concentração de íons hidrogênio:

$$\text{pH} = \log \frac{1}{[\text{H}^+]} = -\log [\text{H}^+]$$

- Quanto maior a acidez de uma solução, mais baixo é o pH. Ácidos fracos se ionizam parcialmente para liberar um íon hidrogênio, baixando, portanto, o pH de uma solução aquosa. Bases fracas aceitam um íon hidrogênio, aumentando o pH. A extensão desses processos é característica de cada ácido ou base fraca e é expressa como uma constante de dissociação ácida:

$$K_{\text{eq}} = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]} = K_a$$

- O $\text{p}K_a$ expressa, em uma escala logarítmica, a força relativa de um ácido ou base fraca:

$$\text{p}K_a = \log \frac{1}{K_a} = -\log K_a$$

- Quanto mais forte o ácido, menor é o valor do seu $\text{p}K_a$; quanto mais forte a base, maior é o valor do $\text{p}K_a$. O $\text{p}K_a$ pode ser determinado experimentalmente; é o pH no ponto central da curva de titulação para o ácido ou a base.

2.3 Tamponamento contra mudanças no pH em sistemas biológicos

Quase todos os processos biológicos dependem do pH; uma pequena mudança no pH produz uma grande mudança na velocidade do processo. Isso é válido não somente para as muitas reações nas quais os íons H^+ participam diretamente, mas também para aquelas reações nas quais aparentemente não há participação de íons H^+ . As enzimas que catalisam reações celulares, e muitas das moléculas sobre as quais elas agem, contêm grupos ionizáveis com valores de $\text{p}K_a$ característicos. Os grupos amino e carboxila protonados de aminoácidos e os grupos fosfato de nucleotídeos, por exemplo, agem como ácidos fracos; o seu estado iônico é determinado pelo pH do meio circundante. (Quando um grupo ionizável fica preso no meio de uma proteína, longe do solvente aquoso, o seu $\text{p}K_a$, ou o $\text{p}K_a$ aparente, pode ser significativamente diferente do seu pH em água.) Como observado anteriormente, as interações iônicas estão entre as forças que estabilizam as moléculas de proteína e permitem que uma enzima reconheça e se ligue ao seu substrato.

Células e organismos mantêm um pH citosólico específico e constante, em geral perto de pH 7, mantendo

biomoléculas em um estado iônico ótimo. Em organismos multicelulares, o pH dos líquidos extracelulares também é rigorosamente regulado. A constância do pH é atingida principalmente por tampões biológicos: misturas de ácidos fracos e suas bases conjugadas.

Tampões são misturas de ácidos fracos e suas bases conjugadas

Os **tampões** são sistemas aquosos que tendem a resistir a mudanças de pH quando pequenas quantidades de ácido (H^+) ou base (OH^-) são adicionadas. Um sistema tampão consiste em um ácido fraco (o doador de prótons) e a sua base conjugada (o receptor de prótons). Exemplificando, uma mistura de concentrações iguais de ácido acético e íons acetato, encontrada no ponto central da titulação na Figura 2-17, é um sistema tampão. Observe que a curva de titulação do ácido acético tem uma zona relativamente plana que se estende por cerca de uma unidade de pH em ambos os lados do pH do ponto central de 4,76. Nessa zona, uma dada quantidade de H^+ ou OH^- adicionada ao sistema tem muito menos efeito no pH que a mesma quantidade adicionada fora da zona. Essa zona relativamente plana é a **região de tamponamento** do par tampão ácido acético/acetato. No ponto central da região de tamponamento, no qual a concentração do doador de prótons (ácido acético) é exatamente igual à do receptor de prótons (acetato), a força de tamponamento do sistema é máxima; isto é, o pH muda menos pela adição de H^+ ou OH^- . O pH nesse ponto na curva de titulação do ácido acético é igual ao seu pK_a . O pH do sistema tampão acetato muda levemente quando uma pequena quantidade de H^+ ou OH^- é adicionada, mas essa mudança é muito pequena comparada com a mudança de pH que resultaria se a mesma quantidade de H^+ ou OH^- fosse adicionado à água pura ou a uma solução de um sal de um ácido forte e de uma base forte, como o NaCl, que não tem poder tamponante.

O tamponamento resulta do equilíbrio entre duas reações reversíveis ocorrendo em uma solução na qual as concentrações de doador de prótons e de seu receptor de prótons conjugado são quase iguais. A **Figura 2-19** explica como um sistema tampão funciona. Sempre que H^+ ou OH^- é adicionado em um tampão, o resultado é uma pequena mudança na razão das concentrações relativas dos ácidos fracos e seus ânions e, portanto, uma pequena mudança no pH. Um decréscimo na concentração de um componente do sistema é equilibrado exatamente pelo aumento do outro. A soma dos componentes do tampão não muda, somente a sua razão.

Cada par conjugado ácido-base tem uma zona de pH característica na qual é um tampão efetivo (Figura 2-18). O par $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ tem pK_a de 6,86 e, portanto, pode servir como um sistema tampão efetivo entre os pH 5,9 e 7,9; o par NH_4^+/NH_3 , com um pK_a de 9,25, pode agir como um tampão em um intervalo de pH aproximado entre 8,3 e 10,3.

A equação de Henderson-Hasselbalch relaciona o pH, o pK_a e a concentração do tampão

As curvas de titulação do ácido acético, HPO_4^- e NH_4^+ (Figura 2-18) têm formas quase idênticas, sugerindo que es-

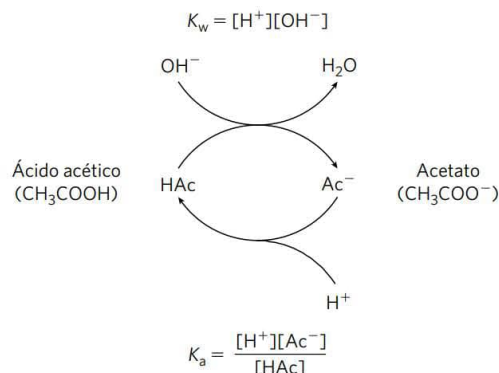


FIGURA 2-19 O par ácido acético/acetato como sistema tampão.

O sistema é capaz de absorver tanto H^+ quanto OH^- por meio da reversibilidade da reação de dissociação do ácido acético. O doador de prótons, ácido acético (HAc), contém uma reserva de H^+ que pode ser liberada para neutralizar uma adição de OH^- ao sistema, formando H_2O . Isso acontece devido ao produto $[H^+][OH^-]$ exceder temporariamente o K_w ($1 \times 10^{-14} M^2$). O equilíbrio rapidamente se ajusta para restaurar o produto a $1 \times 10^{-14} M^2$ (a $25^\circ C$), reduzindo temporariamente a concentração de H^+ . Agora, o quociente $[H^+][Ac^-]/[HAc]$ é menor que K_a , então HAc se dissocia ainda mais para restaurar o equilíbrio. De maneira similar, a base conjugada Ac^- pode reagir com íons H^+ adicionados ao sistema, e novamente as duas reações de ionização simultaneamente chegam ao equilíbrio. Portanto, um par conjugado ácido-base, como o ácido acético e o íon acetato, tende a resistir a mudanças no pH quando pequenas quantidades de ácido ou base são adicionadas. A ação tamponante é simplesmente a consequência de duas reações reversíveis acontecendo simultaneamente e atingindo os seus pontos de equilíbrio determinados pelas constantes de equilíbrio, K_w e K_a .

As curvas refletem uma lei ou relação fundamental. De fato, esse é o caso. A forma da curva de titulação de qualquer ácido fraco é descrita pela equação de Henderson-Hasselbalch, que é importante para entender a ação dos tampões e do equilíbrio acidobásico no sangue e nos tecidos dos vertebrados. Essa equação é simplesmente uma forma útil de reescrever a expressão da constante de ionização de um ácido. Para a ionização de um ácido fraco HA, a equação de Henderson-Hasselbalch pode ser deduzida como se segue:

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}$$

Primeiro, resolve-se para $[H^+]$:

$$[H^+] = K_a \frac{[HA]}{[A^-]}$$

Usando o logaritmo negativo em ambos os lados da equação:

$$-\log [H^+] = -\log K_a - \log \frac{[HA]}{[A^-]}$$

Substituindo pH por $-\log [H^+]$ e pK_a por $-\log K_a$:

$$pH = pK_a - \log \frac{[HA]}{[A^-]}$$

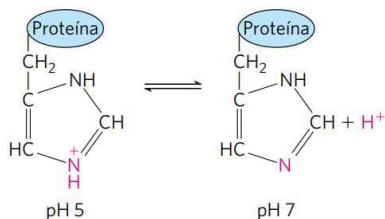


FIGURA 2-20 Ionização da histidina. O aminoácido histidina, um componente das proteínas, é um ácido fraco. O pK_a do nitrogênio protonado da cadeia lateral é 6,0.

Agora, inverta $-\log [HA]/[A^-]$, o que envolve a mudança do sinal, para obter a **equação de Henderson-Hasselbalch**:

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad (2-9)$$

Essa equação é válida para as curvas de titulação de todos os ácidos fracos e permite deduzir algumas relações quantitativas importantes. Por exemplo, mostra por que o pK_a de um ácido fraco é igual ao pH de uma solução no ponto central da titulação. Nesse ponto, $[HA] = [A^-]$ e

$$pH = pK_a + \log 1 = pK_a + 0 = pK_a$$

A equação de Henderson-Hasselbalch também permite (1) calcular o pK_a , dado o pH e a razão molar do doador e do receptor de prótons; (2) calcular o pH, dado o pK_a e a razão molar do doador e do receptor de prótons; e (3) calcular a razão molar entre doador e receptor de prótons, dados o pH e o pK_a .

Ácidos ou bases fracas tamponam células e tecidos contra as mudanças de pH

Os líquidos intracelular e extracelular dos organismos multicelulares têm como característica um pH praticamente constante. A primeira linha de defesa dos organismos contra mudanças internas de pH é proporcionada por sistemas tampão. O citoplasma da grande maioria das células contém altas concentrações de proteínas, e estas contêm muitos aminoácidos com grupos funcionais que são ácidos fracos ou bases fracas. Por exemplo, a cadeia lateral da histidina (**Figura 2-20**) tem pK_a de 6,0 e, por isso, pode existir tanto nas formas protonadas quanto nas formas desprotonadas próximo ao pH neutro. Proteínas contendo resíduos de histidina, portanto, são tampões efetivos próximos ao pH neutro.

PROBLEMA 2-5 Ionização da histidina

Calcule a fração de histidina que tem a cadeia lateral imidazólica protonada em pH de 7,3. Os valores de pK_a para a histidina são $pK_1 = 1,8$, pK_2 (imidazola) = 6,0 e $pK_3 = 9,2$ (ver Figura 3-12b).

Solução: os três grupos ionizáveis na histidina têm valores de pK_a suficientemente diferentes, de forma que o primeiro

($-\text{COOH}$) fica completamente ionizado antes de o segundo (imidazol protonado) começar a dissociar um próton, e o segundo ioniza completamente antes de o terceiro ($-\text{NH}_3^+$) começar a dissociar seu próton. (Com a equação de Henderson-Hasselbalch é possível mostrar facilmente que um ácido fraco passa de 1% ionizado em 2 unidades de pH abaixo do seu pK_a para 99% ionizado em 2 unidades de pH acima de seu pK_a ; ver também Figura 3-12b.) Em pH 7,3, o grupo carboxila da histidina está inteiramente desprotonado ($-\text{COO}^-$) e o grupo α -amino está completamente protonado. Supõe-se que, em pH 7,3, o único grupo que está parcialmente dissociado é o grupo imidazólico, que pode estar protonado (abreviado como HisH^+) ou não protonado (His).

Aplicando-se a equação de Henderson-Hasselbalch:

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

Substituindo-se $pK_2 = 6,0$ e $pH = 7,3$:

$$7,3 = 6,0 + \log \frac{[\text{His}]}{[\text{HisH}^+]}$$

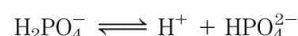
$$1,3 = \log \frac{[\text{His}]}{[\text{HisH}^+]}$$

$$\text{antilog } 1,3 = \frac{[\text{His}]}{[\text{HisH}^+]} = 2,0 \times 10^1$$

Isso dá uma *razão* [His] para $[\text{HisH}^+]$ de 20 para 1. É necessário converter a *fração* da histidina que está na forma desprotonada His em pH 7,3. Essa fração é 20/21 (20 partes de His para cada 1 parte de HisH^+ em um total de 21 partes de histidina em qualquer forma), ou cerca de 95,2%; o resto (100% menos 95,2%) é protonado – aproximadamente 5%.

Nucleotídeos como ATP, assim como muitos metabólitos de baixa massa molecular, contêm grupos ionizáveis que podem contribuir para o poder tampão do citoplasma. Algumas organelas altamente especializadas e compartimentos extracelulares apresentam altas concentrações de compostos que contribuem para a capacidade de tamponamento: ácidos orgânicos tamponam os vacúolos das células das plantas, amônia tampona a urina.

Dois tampões biológicos especialmente importantes são o sistema fosfato e o sistema bicarbonato. O tampão fosfato, que age no citoplasma de todas as células, consiste em H_2PO_4^- como doador de prótons e HPO_4^{2-} como receptor de prótons:



O sistema tampão fosfato é mais efetivo em um pH perto de seu pK_a de 6,86 (Figuras 2-16, 2-18) e, portanto, tende a resistir a mudanças de pH em um intervalo entre 5,9 e 7,9. Este é, então, um tampão efetivo em fluidos biológicos; em mamíferos, por exemplo, líquidos extracelulares e a maioria dos compartimentos citoplasmáticos têm pH no intervalo de 6,9 a 7,4.

PROBLEMA 2-6 Tampões fosfato

(a) Qual é o pH de uma mistura de 0,042 M de NaH_2PO_4 e 0,058 M de Na_2HPO_4 ?

Solução: usamos a equação de Handerson-Hasselbalch, expressa como

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{base conjugada}]}{[\text{ácido}]}$$

Neste caso, o ácido (a espécie que doa um próton) é H_2PO_4^- , e a base conjugada (a espécie que ganha um próton) é HPO_4^{2-} . Substituindo-se a concentração dada de ácido e base conjugados e o valor de $\text{p}K_a$ (6,86),

$$\text{pH} = 6,86 + \log \frac{0,058}{0,042} = 6,86 + 0,14 = 7,0$$

É possível conferir aproximadamente esse resultado. Quando está presente mais base conjugada que ácido, o ácido está mais que 50% titulado e, portanto, o pH está acima do $\text{p}K_a$ (6,86), em que o ácido está exatamente 50% titulado.

(b) Se 1,0 mL de solução NaOH 10 M é adicionado em um litro de tampão preparado como em (a), de quanto será a alteração no pH?

Solução: um litro do tampão contém 0,042 moles de NaH_2PO_4 . A adição de 1,0 mL de solução NaOH 10 M (0,010 mol) poderia titular uma quantidade equivalente (0,010 mol) de NaH_2PO_4 para Na_2HPO_4 , resultando em 0,032 mol de NaH_2PO_4 e 0,068 mol de Na_2HPO_4 . O novo pH é:

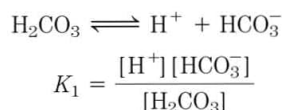
$$\begin{aligned} \text{pH} &= \text{p}K_a + \log \frac{[\text{HPO}_4^{2-}]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]} \\ &= 6,86 + \log \frac{0,068}{0,032} = 6,86 + 0,33 = 7,2 \end{aligned}$$

(c) Se 1,0 mL de solução NaOH 10 M é adicionado a um litro de água pura em pH 7,0, qual será o pH final? Compare esse resultado com a resposta encontrada em (b).

Solução: NaOH se dissocia completamente em Na^+ e OH^- , considerando-se $[\text{OH}^-] = 0,010 \text{ mol/L} = 1,0 \times 10^{-2} \text{ M}$. pOH é o logaritmo negativo de $[\text{OH}^-]$, então $\text{pOH} = 2,0$. Dado que em todas as soluções $\text{pH} + \text{pOH} = 14$, o pH da solução é 12.

Assim, uma quantidade de NaOH que aumenta o pH da água de 7 para 12 aumenta o pH de solução tamponada, como em (b), de 7,0 para 7,2. O poder do tamponamento é grande!

O plasma sanguíneo é tamponado em parte pelo sistema tampão do bicarbonato, consistindo em ácido carbônico (H_2CO_3) como doador de prótons e bicarbonato (HCO_3^-) como receptor de prótons (K_1 é a primeira das várias constantes de equilíbrio no sistema de tamponamento do bicarbonato):



Esse sistema tampão é mais complexo que outros pares ácido-base conjugados, uma vez que um de seus componentes, o ácido carbônico (H_2CO_3), é formado a partir de dióxido de carbono dissolvido (d) e água, em uma reação reversível:



$$K_2 = \frac{[\text{H}_2\text{CO}_3]}{[\text{CO}_2(\text{d})][\text{H}_2\text{O}]}$$

O dióxido de carbono é um gás sob condições normais, e o CO_2 dissolvido em uma solução aquosa está em equilíbrio com o CO_2 em fase gasosa (g):



$$K_3 = \frac{[\text{CO}_2(\text{d})]}{[\text{CO}_2(\text{g})]}$$

O pH de uma solução tampão de bicarbonato depende da concentração de H_2CO_3 e HCO_3^- , os componentes doador e receptor de prótons. A concentração de H_2CO_3 , por sua vez, depende da concentração de CO_2 na fase gasosa, ou da **pressão parcial** de CO_2 , designada por pCO_2 . Portanto, o pH de um tampão bicarbonato exposto a uma fase gasosa é determinado pela concentração de HCO_3^- na fase aquosa e pela pCO_2 na fase gasosa.



A solução tampão de bicarbonato é um tampão fisiológico efetivo em pH próximo de 7,4, uma vez que o H_2CO_3 do plasma sanguíneo está em equilíbrio com uma grande capacidade de reserva de CO_2 (g) no ar contido nos pulmões. Como discutido anteriormente, esse sistema de tamponamento envolve três equilíbrios reversíveis, neste caso entre o CO_2 gasoso nos pulmões e o bicarbonato (HCO_3^-) no plasma sanguíneo (**Figura 2-21**).

O sangue pode recolher H^+ do ácido láctico produzido no tecido muscular durante um exercício vigoroso. De modo alternativo, ele pode perder H^+ , na protonação do NH_3 produzido durante o catabolismo das proteínas. Quando H^+ é adicionado ao sangue à medida que ele passa pelos tecidos, a reação 1 da Figura 2-21 caminha para um novo equilíbrio, no qual a $[\text{H}_2\text{CO}_3]$ aumenta. Isso, por sua vez, aumenta a $[\text{CO}_2(\text{d})]$ no sangue (reação 2), au-

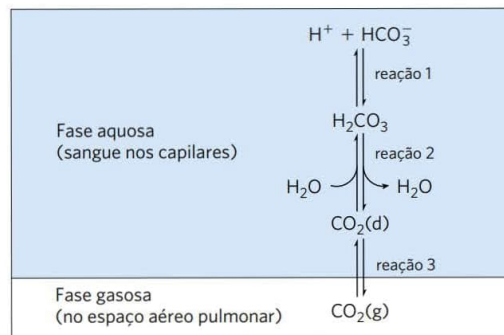


FIGURA 2-21 O sistema tampão do bicarbonato. O CO_2 no espaço aéreo pulmonar está em equilíbrio com o tampão bicarbonato do plasma sanguíneo que circula pelos capilares pulmonares. Como a concentração de CO_2 dissolvido pode ser ajustada rapidamente por mudanças na taxa de respiração, o sistema tampão bicarbonato do sangue está em estreito equilíbrio com um grande reservatório potencial de CO_2 .

mentando, assim, a pressão parcial de $\text{CO}_2(\text{g})$ no ar dos pulmões (reação 3); o CO_2 excedente é exalado. Inversamente, quando H^+ é perdido do sangue, a situação oposta ocorre: mais H_2CO_3 é dissociado em H^+ e HCO_3^- e, portanto, mais CO_2 dos pulmões se dissolve dentro do plasma. A taxa de respiração – que é a taxa de inalação e exalação – pode ajustar rapidamente esses equilíbrios para manter o pH sanguíneo relativamente constante. A taxa de respiração é controlada pelo tronco encefálico, no qual a detecção de um aumento de pCO_2 no sangue ou uma diminuição do pH sanguíneo desencadeia uma respiração mais profunda e com maior frequência.

A hiperventilação (a respiração ofegante), provocada por estresse ou ansiedade, inverte o balanço normal entre o O_2 inspirado e o CO_2 expirado, favorecendo que mais CO_2 seja expirado, elevando, assim, o pH do sangue para 7,45 ou mais. Essa alcalose produz tonteira, dor de cabeça, fraqueza e perda de consciência. Um remédio caseiro para a alcalose moderada é respirar brevemente em um saco de papel. O ar dentro do saco fica enriquecido em CO_2 , e a inalação desse ar aumenta a concentração de CO_2 no sangue e no organismo, levando à diminuição do pH sanguíneo.

No pH do plasma sanguíneo (7,4) muito pouco de H_2CO_3 está presente em comparação com HCO_3^- , e a adição de uma pequena quantidade de base (NH_3 ou OH^-) poderia titular esse H_2CO_3 , exaurindo a capacidade tamponante. A importância do papel do H_2CO_3 ($\text{p}K_a = 3,57$ a 37°C) no tamponamento do plasma sanguíneo (pH $\sim 7,4$) parece contradizer a afirmação anterior de que um tampão é mais efetivo na escala de uma unidade de pH acima e abaixo do valor de $\text{p}K_a$. A explicação para esse aparente paradoxo é o grande estoque de $\text{CO}_2(\text{d})$ no sangue. O seu rápido equilíbrio com H_2CO_3 resulta na formação adicional de H_2CO_3 :



Na clínica médica, é útil ter uma maneira simples de expressar o pH do sangue em termos de CO_2 dissolvido, o qual geralmente é monitorado junto com outros gases sanguíneos. Pode-se definir uma constante, K_h , que é a constante de equilíbrio para a hidratação de CO_2 , formando H_2CO_3 :

$$K_h = \frac{[\text{H}_2\text{CO}_3]}{[\text{CO}_2(\text{d})]}$$

(A concentração de água é tão grande (55,5 M) que a dissolução de CO_2 não muda $[\text{H}_2\text{O}]$ significativamente. Assim, $[\text{H}_2\text{O}]$ faz parte da constante K_h .) Então, considerando-se o estoque de $\text{CO}_2(\text{d})$, é possível expressar $[\text{H}_2\text{CO}_3]$ como $K_h[\text{CO}_2(\text{d})]$, e substituir $[\text{H}_2\text{CO}_3]$ na equação da dissociação ácida do H_2CO_3 :

$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]} = \frac{[\text{H}^+][\text{HCO}_3^-]}{K_h[\text{CO}_2(\text{d})]}$$

Agora, o equilíbrio total para a dissociação do H_2CO_3 pode ser expresso como:

$$K_h K_a = K_{\text{combinado}} = \frac{[\text{H}^+][\text{HCO}_3^-]}{[\text{CO}_2(\text{d})]}$$

É possível calcular o valor da nova constante, $K_{\text{combinado}}$, e o correspondente $\text{p}K$ aparente, ou $\text{p}K_{\text{combinado}}$, a partir dos va-

lores determinados experimentalmente de K_h ($3,0 \times 10^{-3} \text{ M}$) e K_a ($2,7 \times 10^{-4} \text{ M}$) a 37°C :

$$\begin{aligned} K_{\text{combinado}} &= (3,0 \times 10^{-3} \text{ M})(2,7 \times 10^{-4} \text{ M}) \\ &= 8,1 \times 10^{-7} \text{ M}^2 \\ \text{p}K_{\text{combinado}} &= 6,1 \end{aligned}$$

Na clínica médica, é comum se referir ao $\text{CO}_2(\text{d})$ como o ácido conjugado e usar o valor de 6,1 do $\text{p}K_a$ aparente, ou combinado, para simplificar os cálculos de pH a partir da $[\text{CO}_2(\text{d})]$. A concentração de CO_2 dissolvido é uma função da pCO_2 , que nos pulmões é cerca de 4,8 kilopascal (kPa), correspondendo a $[\text{H}_2\text{CO}_3] \approx 1,2 \text{ mM}$. Como $[\text{HCO}_3^-]$ plasmática é normalmente cerca de 24 mM, $[\text{HCO}_3^-]/[\text{H}_2\text{CO}_3]$ é cerca de 20 e o pH do sangue é $6,1 + \log 20 \approx 7,4$. ■

Diabetes não tratado produz uma acidose que traz risco de vida



O plasma sanguíneo humano normalmente tem um pH de 7,35 a 7,45, e muitas das enzimas que funcionam no sangue evoluíram para ter a atividade máxima nesse intervalo de pH. As enzimas apresentam a atividade catalítica máxima em um pH característico, chamado de **pH ótimo (Figura 2-22)**. Em geral, a atividade catalítica diminui rapidamente quando o pH muda para qualquer um dos lados desse pH ótimo. Portanto, uma pequena mudança no pH pode fazer uma grande diferença na velocidade de algumas reações cruciais catalisadas por enzimas. O controle biológico do pH das células e dos fluidos biológicos é de importância central em todos os aspectos do metabolismo e atividades celulares, e mudanças no pH sanguíneo têm consequências fisiológicas marcantes, como pode ser visto nos experimentos perigosos descritos no Quadro 2-1.

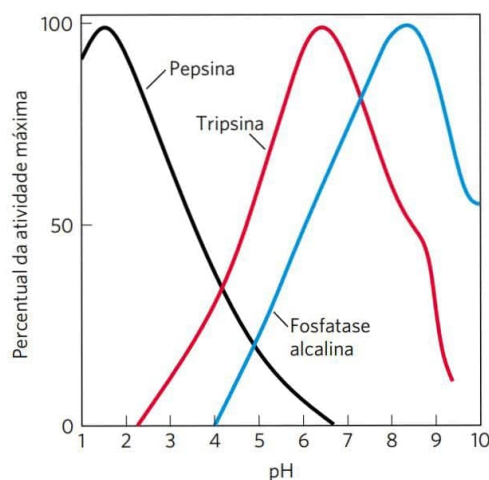


FIGURA 2-22 O pH ótimo de algumas enzimas. A pepsina é uma enzima digestiva secretada no suco gástrico, que tem pH próximo de 1,5, o que a permite funcionar de forma ótima. A tripsina, uma enzima digestiva que age no intestino delgado, tem um pH ótimo que se assemelha ao pH neutro do lúmen do intestino delgado. A fosfatase alcalina do tecido ósseo é uma enzima hidrolítica que presumivelmente auxilia na mineralização dos ossos.

QUADRO 2-1



MEDICINA

Sendo seu próprio cobaio (Não tente fazer isso em casa!)

“Eu queria descobrir o que aconteceria com um homem se ele fosse mais ácido ou mais alcalino[...] Poder-se-ia, claro, primeiro fazer experimentos em um coelho. Na realidade, foram feitos alguns trabalhos nesse sentido, mas é difícil, de qualquer forma, ter certeza de como um coelho se sente. Na verdade, alguns coelhos não levavam a sério a possibilidade de cooperar comigo.”

—J. B. S. Haldane, *Possible Worlds*,
Harper and Brothers, 1928

Cem anos atrás, o fisiologista e geneticista J. B. S. Haldane e seu colega H. W. Davies decidiram experimentar neles mesmos para estudar como o organismo controla o pH sanguíneo. Eles se alcalinizaram por meio de hiperventilação e ingestão de bicarbonato de sódio, o que os deixou com dificuldade respiratória e uma cefaleia muito forte. Eles tentaram se acidificar ingerindo ácido clorídrico, mas calcularam que teriam de tomar quatro litros de ácido clorídrico diluído para chegar ao efeito desejado, e meio litro já seria suficiente para dissolver os dentes e queimar a garganta. Finalmente, Haldane chegou à conclusão de

que se comesse cloreto de amônio, ele seria degradado no organismo, liberando ácido clorídrico e amônia. No fígado, a amônia poderia ser convertida em ureia, um produto inócuo. O ácido clorídrico se combinaria com o bicarbonato de sódio, que existe em todos os tecidos, produzindo cloreto de sódio e dióxido de carbono. Esse experimento levaria a uma respiração ofegante que mimetizaria a acidose diabética e o estágio final da doença renal.

Simultaneamente, Ernst Freudenberg e Paul György, pediatras em Heidelberg, estavam estudando a tetania, contrações musculares que ocorrem nas mãos, nos braços, nos pés e na laringe em crianças. Eles sabiam que algumas vezes ocorria tetania em pacientes que perderam grandes quantidades de ácido clorídrico por vômito constante e raciocinaram que se a alcalinização dos tecidos produzia tetania a acidificação poderia curá-la. Quando leram a publicação de Haldane sobre os efeitos do cloreto de amônio, eles tentaram administrá-lo a bebês com tetania e ficaram maravilhados ao ver que a tetania passava em poucas horas. Esse tratamento não removeu a causa primária da tetania, mas deu sobrevida para as crianças e tempo para o médico investigar as causas.

Em indivíduos com diabetes melito não tratado, a falta de insulina, ou a insensibilidade à insulina (dependendo do tipo de diabetes), interrompe a captação de glicose do sangue para dentro dos tecidos e os força a usar os ácidos graxos armazenados como principal combustível. Devido a razões que serão descritas em detalhes posteriormente (ver Figura 24-31), a dependência de ácidos graxos leva ao acúmulo de altas concentrações de dois ácidos carboxílicos, o ácido β -hidroxibutírico e o ácido acetoacético (nível de 90 mg/100 mL no plasma sanguíneo, comparada com < 3 mg/100 mL nos indivíduos saudáveis; excreção urinária de 5 g/24 h, comparada com < 125 mg/24 h nos controles saudáveis). A dissociação desses ácidos diminui o pH do plasma sanguíneo para valores menores que 7,35, causando acidose. Acidose grave leva a sintomas como cefaleia, vômitos e diarreia, seguido de estupor, convulsões e coma, provavelmente porque em pH mais baixos algumas enzimas já não funcionam otimamente. Quando um paciente apresenta glicose alta no sangue, baixo pH plasmático e altos níveis de ácido β -hidroxibutírico e ácido acetoacético na urina e no sangue, o diagnóstico mais provável é diabetes melito.

Outras condições também podem produzir acidose. Jejum e inanição forçam o uso dos estoques de ácidos graxos para produção de energia, com as mesmas consequências geradas pelo diabetes. Esforço físico exagerado, como corrida para atletas ou ciclistas, leva a um acúmulo temporário de ácido láctico no sangue. A deficiência renal leva a uma diminuição da capacidade de regular os níveis de bicarbonato. Doenças do pulmão (como enfisema, pneumonia e asma) reduzem a capacidade de eliminar o CO_2 produzido por oxidação dos combustíveis nos tecidos, com o resultan-

te acúmulo de H_2CO_3 . O tratamento da acidose é feito de acordo com a condição apresentada – insulina para pessoas com diabetes; esteroides ou antibióticos para pessoas com doenças pulmonares. Acidose grave pode ser revertida pela administração intravenosa de solução de bicarbonato. ■

PROBLEMA 2-7 Tratamento de acidose com bicarbonato

Por que a administração intravenosa de uma solução de bicarbonato aumenta o pH do plasma sanguíneo?

Solução: a razão entre $[\text{HCO}_3^-]$ e $[\text{CO}_2(\text{d})]$ determina o pH do tampão de bicarbonato, de acordo com a equação

$$\text{pH} = 6,1 + \log \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]}$$

em que $[\text{H}_2\text{CO}_3]$ está diretamente relacionada com pCO_2 , a pressão parcial de CO_2 . Então, se $[\text{HCO}_3^-]$ aumentar sem mudança na pCO_2 , o pH aumentará.

RESUMO 2.3 Tamponamento contra mudanças no pH em sistemas biológicos

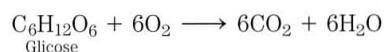
- Uma mistura de um ácido fraco (ou base) e seus sais resiste a mudanças de pH causadas pela adição de H^+ ou OH^- . A mistura, portanto, funciona como tampão.
- O pH de uma solução de um ácido ou base fraca e seus sais é dado pela equação de Henderson-Hasselbalch:
$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

- Em células e tecidos, tampões de fosfatos e bicarbonatos mantêm os líquidos intracelular e extracelular em seu pH ótimo (fisiológico), que, em geral, é próximo de 7. As enzimas costumam ter atividade ótima nesse pH.
- Condições de saúde que diminuem o pH sanguíneo, causando acidose, ou aumentam, causando alcalose, podem levar a risco de morte.

2.4 A água como reagente

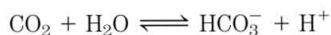
A água não é apenas o solvente no qual as reações químicas das células vivas ocorrem; muitas vezes é um participante direto nessas reações. A formação de ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico é um exemplo de uma **reação de condensação**, na qual os elementos da água são eliminados (Figura 2-23). O reverso dessa reação – clivagem acompanhada pela adição de elementos da água – é uma **reação de hidrólise**. As reações de hidrólise são também responsáveis pela despolimerização enzimática de proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos. As reações de hidrólise, catalisadas por enzimas chamadas de **hidrolases**, são quase sempre exergônicas; pela produção de duas moléculas a partir de uma, elas levam a um aumento do grau de desordem do sistema. A formação de polímeros celulares a partir das suas subunidades por simples reversão da hidrólise (i.e., por reações de condensação) seria endergônica e, portanto, não ocorre. Como será visto, as células contornam esse obstáculo termodinâmico pelo acoplamento das reações de condensação endergônicas a processos exergônicos, como a quebra de ligação anidrido do ATP.

Você está consumindo oxigênio à medida que está lendo. A água e o dióxido de carbono são os produtos finais de uma oxidação de combustível como a glicose. A reação global pode ser descrita como:



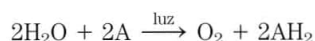
A “água metabólica” formada pela oxidação de alimentos e gorduras armazenadas é, na verdade, suficiente para permitir que alguns animais (rato-do-deserto, rato-canguru, camelos) sobrevivam por longos períodos de tempo em ambientes muito secos sem beber água.

O CO_2 produzido por oxidação da glicose é convertido nos eritrócitos ao produto mais solúvel HCO_3^- , em uma reação catalisada pela enzima anidrase carbônica:



Nessa reação, a água não somente é um substrato, mas também participa na transferência de prótons pela formação de uma rede de moléculas de água unidas por ligações de hidrogênio onde ocorrem os saltos de prótons (Figura 2-14).

Plantas verdes e algas usam a energia da luz solar para quebrar a molécula de água no processo de fotossíntese:



Nessa reação, A é uma espécie aceptora de elétrons, que varia com o tipo de organismo fotossintético, e a água serve como doador de elétrons em uma sequência de reações de

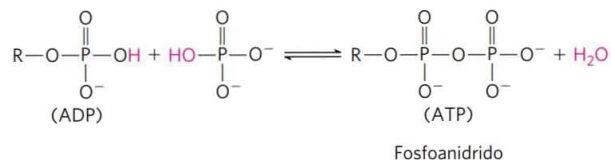


FIGURA 2-23 Participação da água nas reações biológicas. ATP é um fosfoanidrido formado pela reação de condensação (perda de elementos da água) entre ADP e fosfato. R representa o monofosfato de adenosina (AMP). Esta reação de condensação requer energia. A hidrólise do ATP (adição de elementos da água) para formar ADP e fosfato libera uma quantidade equivalente de energia. Estas reações de condensação e hidrólise do ATP são somente um dos exemplos do papel da água como reagente nos processos biológicos.

oxidação-redução (ver Figura 20-14) fundamental para todos os organismos vivos.

RESUMO 2.4 A água como reagente

- A água é tanto o solvente no qual as reações metabólicas ocorrem quanto um reagente que participa em muitos processos bioquímicos, incluindo hidrólise, condensação e reações de oxidação-redução.

2.5 O ajuste do meio aquoso em organismos vivos

Os organismos estão muito bem adaptados aos seus ambientes aquosos e desenvolveram meios de explorar as propriedades incomuns (peculiares) da água. O alto valor do calor específico da água (a energia térmica necessária para aumentar a temperatura de 1 g de água em 1°C) é útil para as células e os organismos, pois permite que a água atue como “tampão térmico”, mantendo a temperatura de um organismo relativamente constante, enquanto a temperatura do meio ambiente varia e há geração de calor como subproduto do metabolismo. Além disso, alguns vertebrados exploram o alto calor de vaporização da água (Tabela 2-1) e usam isso para eliminar o excesso de calor do corpo (portanto, perdem calor), evaporando o suor. O alto grau de coesão interna da água líquida, devido às ligações de hidrogênio, é aproveitado por plantas como meio de transportar nutrientes das raízes até as folhas durante o processo de transpiração. Até a densidade do gelo, menor que a da água líquida, tem consequências biológicas no ciclo da vida de organismos aquáticos. As lagoas congelam de cima para baixo, e a camada de gelo isola a água de baixo do ar frio, impedindo-a (e os organismos nela) de congelar totalmente. Mais fundamental ainda para todos os seres vivos é o fato de que muitas das propriedades físicas e químicas das macromoléculas celulares, particularmente as proteínas e os ácidos nucleicos, são consequência das suas interações com moléculas de água do meio circundante. A influência da água no curso da evolução biológica é determinante e profunda. Caso algumas formas de vida tenham se desenvolvido em algum outro lugar no universo, é improvável que tenham semelhança com a vida na Terra, a menos que água líquida também seja abundante no planeta onde essas formas de vida se originaram.

Termos-chave

Os termos em **negrito** estão definidos no glossário.

ligação de hidrogênio 48	produto iônico da água 59
energia de ligação 48	(K_w) 59
hidrofílico 50	pH 60
hidrofóbico 50	acidose 61
anfipático 52	alcalose 61
micela 52	par conjugado
efeito hidrofóbico 52	ácido-base 61
interações	constante de dissociação
hidrofóbicas 53	ácida (K_a) 62
forças de van der	pK_a 62
Waals 53	curva de titulação 62
osmolaridade 55	tampão 64
osmose 56	região de
isotônico 56	tampão 64
hipertônico 56	equação de Henderson-
hipotônico 56	Hasselbalch 65
constante de equilíbrio	condensação 69
(K_{eq}) 58	hidrólise 69

Teste seu conhecimento

1. Efeito do ambiente local na intensidade das ligações iônicas Caso o sítio de ligação a ATP de uma enzima estiver localizado no interior da enzima, em um ambiente hidrofóbico, a interação iônica entre a enzima e o substrato será mais forte ou mais fraca do que a mesma interação na superfície da enzima exposta à água? Por quê?

2. A vantagem biológica das interações fracas As interações entre biomoléculas são geralmente estabilizadas por interações fracas, como as ligações de hidrogênio. Como isso pode ser vantajoso para os organismos?

3. Solubilidade do etanol em água Explique por que o etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) é mais solúvel na água que o etano (CH_3CH_3).

4. Cálculo do pH a partir da concentração do íon hidrogênio Qual é o pH de uma solução com concentração de H^+ de (a) $1,75 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$; (b) $6,50 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$; (c) $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$; (d) $1,50 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$?

5. Cálculo da concentração de íons hidrogênio a partir do pH Qual é a concentração de H^+ de uma solução com pH de (a) 3,82; (b) 6,52; (c) 11,11?

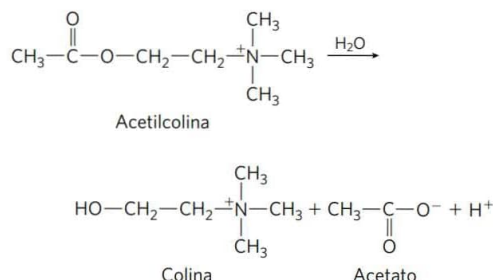


6. Acidez do HCl gástrico No laboratório de um hospital, uma amostra de 10 mL de suco gástrico, obtida muitas horas depois de uma refeição, foi titulada com 0,1 M NaOH até a neutralidade; foram necessários 7,2 mL de NaOH. O estômago do paciente não continha nenhuma comida ou bebida, então se supõe que não havia nenhum tampão no material coletado. Qual era o pH do suco gástrico?

7. Cálculo do pH de um ácido ou base forte (a) Escreva a reação de dissociação ácida para o ácido clorídrico. (b) Calcule o pH de uma solução de $5,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ de HCl. (c) Escreva a reação de dissociação ácida para o hidróxido de sódio. (d) Calcule o pH de uma solução de $7,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ de NaOH.

8. Cálculo do pH a partir da concentração de um ácido forte Calcule o pH de uma solução preparada pela diluição de 3,0 mL de HCl 2,5 M até um volume final de 100 mL com água.

9. Determinação dos níveis de acetilcolina pela mudança do pH A concentração de acetilcolina (um neurotransmissor) em uma amostra pode ser determinada a partir da mudança de pH que acompanha a sua hidrólise. Quando a amostra é incubada com a enzima acetilcolinesterase, a acetilcolina é convertida a colina e ácido acético, que se dissocia nas formas acetato e íon hidrogênio:



Em uma análise típica, 15 mL de uma solução aquosa contendo uma quantidade desconhecida de acetilcolina tinha pH 7,65. Quando incubada com acetilcolinesterase, o pH da solução diminuiu para 6,87. Supondo-se que não havia tampão na mistura de incubação, determine o número de moles de acetilcolina em 15 mL de amostra.

10. Significado físico de pK_a Qual das soluções aquosas seguintes tem o menor pH: 0,1 M de HCl, 0,1 M de ácido acético ($pK_a = 4,86$) ou 0,1 M de ácido fórmico ($pK_a = 3,75$)?

11. Significado de K_a e pK_a (a) Um ácido forte tem tendência maior ou menor de perder seu próton do que um ácido fraco? (b) Um ácido forte tem K_a maior ou menor que um ácido fraco? (c) Um ácido forte tem pK_a maior ou menor que um ácido fraco?

12. Vinagre simulado Uma maneira de fabricar vinagre (não a preferida) é preparando uma solução de ácido acético, o único componente ácido do vinagre, em um pH correto (ver Figura 2-15) com a adição de condimentos apropriados. O ácido acético (M_r 60) é líquido a 25°C, com densidade de 1,049 g/mL. Calcule o volume que deve ser adicionado à água destilada para fazer 1 L de vinagre simulado (ver Figura 2-16).

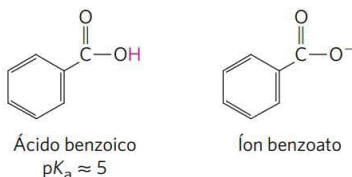
13. Identificando a base conjugada Qual é a base conjugada em cada um dos pares abaixo:

- (a) RCOOH , RCOO^-
- (b) H_2PO_4^- , H_3PO_4
- (c) RNH_2 , RNH_3^+
- (d) H_2CO_3 , HCO_3^-

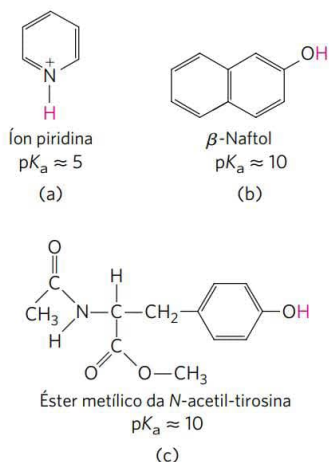
14. Cálculo do pH de uma mistura de um ácido fraco e sua base conjugada Calcule o pH de uma solução diluída que contém a razão molar entre o acetato de potássio e o ácido acético ($pK_a = 4,76$) de: (a) 2:1; (b) 1:3; (c) 5:1; (d) 1:1; (e) 1:10.

15. Efeito do pH na solubilidade As propriedades altamente polares das ligações de hidrogênio da água a tornam um excelente solvente para espécies iônicas (carregadas). Em contrapartida, moléculas orgânicas não ionizadas e apolares, como benzeno, são relativamente insolúveis em água. Em princípio, a solubilidade em água de qualquer ácido ou base orgânica pode ser aumentada pela conversão das moléculas nas respectivas es-

pécies iônicas. Por exemplo, a solubilidade do ácido benzoico em água é baixa. A adição de bicarbonato de sódio em uma mistura de água e ácido benzoico aumenta o pH e desprotona o ácido benzoico, formando benzoato, que é totalmente solúvel em água.

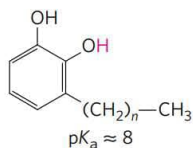


Os compostos a seguir são mais solúveis em solução aquosa de 0,1 M de NaOH ou 0,1 M de HCl? (Os prótons dissociados são mostrados em vermelho.)



16. Tratamento de erupções da pele causadas por hera venenosa

Os componentes da hera venenosa que produzem uma coceira característica são catecóis contendo cadeias longas alquila.



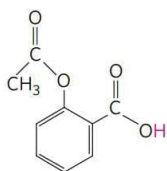
Caso você fosse exposto à hera venenosa, qual dos tratamentos abaixo você escolheria para aplicar na área afetada? Justifique sua resposta.

- Lavar a área com água fria.
- Lavar a área com vinagre diluído ou suco de limão.
- Lavar a área com sabão e água.
- Lavar a área com sabão, água e bicarbonato de sódio.



17. pH e absorção de fármacos

O ácido acetilsalicílico é um ácido fraco com pK_a de 3,5 (o H ionizável é mostrado em vermelho):

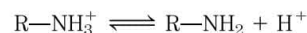


Ele é absorvido para o sangue pelas células que revestem o estômago e o intestino delgado. A absorção requer a passagem através da membrana plasmática, cuja velocidade é determinada pela polaridade da molécula: moléculas carregadas e altamente polares passam lentamente, ao passo que moléculas hidrofóbicas neutras passam rapidamente. O pH do conteúdo estomacal é de cerca de 1,5, e o pH do conteúdo do intestino delgado é de aproximadamente 6. A maior quantidade de ácido acetilsalicílico na corrente sanguínea é absorvida no estômago ou no intestino delgado? Justifique claramente a resposta.

18. Cálculo do pH a partir das concentrações molares
Qual é o pH de uma solução que contém 0,12 mol/L de NH_4Cl e 0,03 mol/L de NaOH (pK_a de $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ é 9,25)?

19. Cálculo do pH após a titulação com um ácido fraco
Um composto tem pK_a de 7,4. Em 100 mL de uma solução de 1,0 M desse composto a pH 8,0 é adicionado um volume de 30 mL de uma solução 1,0 M de ácido clorídrico. Qual é o pH da solução resultante?

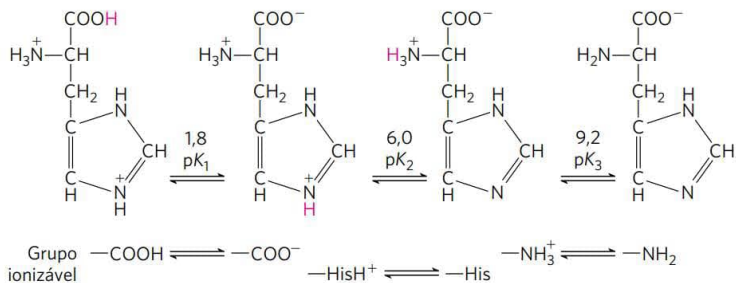
20. Propriedades de um tampão O aminoácido glicina é frequentemente usado como o ingrediente principal de um tampão em experimentos de bioquímica. O grupo amino da glicina, que tem pK_a de 9,6, pode existir tanto na forma protonada ($-\text{NH}_3^+$) quanto como base livre ($-\text{NH}_2$), devido ao equilíbrio reversível:



- Em qual intervalo de pH a glicina pode ser usada como tampão efetivo devido ao seu grupo amino?
- Em uma solução de 0,1 M de glicina em pH 9, qual a fração de glicina que tem os seus grupos amino na forma $-\text{NH}_3^+$?
- Quanto de KOH 5 M deve ser adicionado em 1 L de uma solução de glicina 0,1 M a pH 9,0 para mudar o pH para exatamente 10,0?
- Quando 99% da glicina está na forma $-\text{NH}_3^+$, qual é a relação numérica entre o pH da solução e o pK_a do grupo amino?

21. Cálculo do pK_a de um grupo ionizável por titulação
Os valores pK_a de um composto com dois grupos ionizáveis são $pK_1 = 4,10$ e pK_2 entre 7 e 10. Uma bioquímica tem 10 mL de uma solução 1,0 M desse composto com um pH em 8,00. Ela adiciona 10,0 mL de HCl 1,00 M, o que muda o pH para 3,20. Qual é o pK_2 ?

22. Cálculo do pH de uma solução de ácido poliprótico
A histidina tem grupo ionizável com valores pK_a de 1,8, 6,0 e 9,2, como mostrado abaixo (His = grupo imidazol). Uma bioquímica tem 100 mL de uma solução 0,100 M de histidina com pH 5,40. Ela então adiciona 40 mL de HCl 0,10 M. Qual é o pH da solução resultante?



23. Cálculo do pH original a partir do pH final após titulação Uma bioquímica tem 100 mL de uma solução a 0,10 M de um ácido fraco com pK_a de 6,3. Ela adiciona 6,0 mL de HCl 1,0 M, o que muda o pH para 5,7. Qual é o pH original da solução?

24. Preparação de um tampão fosfato Qual a razão molar de HPO_4^{2-} para H_2PO_4^- em solução que produziria um pH de 7,0? Ácido fosfórico (H_3PO_4), um ácido triprótico, tem três valores de pK_a : 2,14, 6,86 e 12,4. Dica: somente um dos valores de pK_a é relevante.

25. Preparação de um tampão-padrão para calibração de um pH-metro O eletrodo de vidro usado em pH-metros comerciais fornece uma resposta elétrica proporcional à concentração dos íons de hidrogênio. Para converter essas respostas para uma leitura de pH, o eletrodo deve ser calibrado com soluções padrão de concentração de H^+ conhecida. Determine o peso, em gramas, de fosfato diácido de sódio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Mr 138) e hidrogenofosfato dissódico (Na_2HPO_4 ; massa molecular = 142) necessário para preparar 1 L de um tampão padrão a pH 7 com concentração total de fosfato de 0,100 M (ver Figura 2-16). Ver no problema 24 os valores de pK_a do ácido fosfórico.

26. Cálculo da razão molar entre a base conjugada e o ácido fraco a partir do pH Para um ácido fraco com um pK_a de 6, calcule a razão da base conjugada para o ácido em pH 5,0.

27. Preparação de um tampão de força e pH conhecidos Dadas as soluções de 0,10 M de ácido acético ($pK_a = 4,76$) e acetato de sódio, descreva como se pode preparar 1,0 L de tampão de acetato de pH 4,0.

28. Escolha de ácido fraco para tampão Qual desses compostos seria o melhor tampão em pH 5,0: ácido fórmico ($pK_a = 3,8$), ácido acético ($pK_a = 4,76$) ou etilamina ($pK_a = 9,0$)? Justifique brevemente sua resposta.

29. Trabalhando com tampões Um tampão contém 0,010 mol de ácido láctico ($pK_a = 3,86$) e 0,050 mol de lactato de sódio por litro. (a) Calcule o pH do tampão. (b) Calcule a mudança no pH quando um volume de 5 mL de HCl 0,5 M é adicionado em 1 L de tampão. (c) Que mudança de pH se espera caso fosse adicionada a mesma quantidade de HCl em 1 L de água pura?

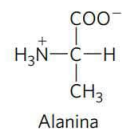
30. Uso das concentrações molares para cálculo do pH Qual é o pH de uma solução que contém 0,20 M de acetato de sódio e 0,60 M de ácido acético ($pK_a = 4,76$)?

31. Preparação de tampão acetato Calcule as concentrações de ácido acético ($pK_a = 4,76$) e acetato de sódio necessárias para preparar uma solução tampão 0,2 M de pH 5,0.

32. pH de uma secreção de defesa de um inseto Você já deve ter observado um inseto que se defende dos inimigos pela secreção de um líquido cáustico. Uma análise do líquido mostra uma concentração total de formato mais ácido fórmico ($K_a = 1,8 \times 10^{-4}$) de 1,45 M. A concentração do íon formato é de 0,015 M. Qual é o pH da secreção? Qual é o pH da secreção?

33. Cálculo de pK_a Um composto desconhecido, X, tem um grupo carboxílico com pK_a de 2,0 e outro grupo ionizável com pK_a entre 5 e 8. Quando 75 mL de NaOH 0,1 M é adicionado a 100 mL de uma solução 0,1 M de X em pH 2,0, o pH aumenta para 6,72. Calcule o pK_a do segundo grupo ionizável de X.

34. Formas iônicas da alanina A alanina é um ácido diprótico que pode sofrer duas reações de dissociação (consultar na Tabela 3-1 os valores de pK_a). (a) Dada a estrutura parcialmente protonada (ou zwitteriônica; ver Figura 3-9) a seguir, desenhe as estruturas químicas das outras duas formas da alanina que predominam em solução aquosa: a forma totalmente protonada e a forma totalmente desprotonada.



Qual das três formas possíveis da alanina estará presente em maior concentração em soluções com os seguintes pH: (b) 1,0; (c) 6,2; (d) 8,02; (e) 11,9. Explique a sua resposta de acordo com o pH relacionado aos dois valores de pK_a .

35. Controle do pH sanguíneo pela respiração

- A pressão parcial do CO_2 nos pulmões pode variar rapidamente pela frequência e profundidade da respiração. Por exemplo, um fármaco comum para aliviar soluços é o aumento da concentração de CO_2 nos pulmões. Isso pode ser atingido prendendo-se a respiração, respirando lenta e superficialmente (hipoventilação) ou respirando dentro de um saco de papel. Sob essas condições, o $p\text{CO}_2$ no espaço aéreo dos pulmões sobe acima do normal. Explique em termos qualitativos o efeito desses procedimentos no pH sanguíneo.
- Uma prática comum entre competidores de corrida de curta distância é a respiração rápida e profunda (hiperventilação) por cerca de meio minuto para remover o excesso de CO_2 de seus pulmões um pouco antes da corrida começar. O pH sanguíneo pode aumentar para 7,6. Explique por que o pH sanguíneo aumenta.
- Durante uma corrida de curta distância, os músculos produzem grande quantidade de ácido láctico ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$; $K_a = 1,38 \times 10^{-4}$ M) a partir da glicose armazenada. Tendo em vista esse fato, por que a hiperventilação antes de uma corrida pode ser útil?

36. Cálculo de pH sanguíneo a partir dos níveis de CO_2 e bicarbonato Calcule o pH de uma amostra de plasma com uma concentração total de CO_2 de 26,9 mM e uma concentração de bicarbonato de 25,6 mM. Rever, na página 67, a importância do pK_a de 6,1 do ácido carbônico.

37. Efeito de prender a respiração no pH sanguíneo O pH dos líquidos extracelulares é tamponado pela relação entre as concentrações de bicarbonato e ácido carbônico sanguíneo. Prender a respiração pode aumentar os níveis de CO_2 no sangue. Que efeito isso pode ter no pH dos líquidos extracelulares? Explique mostrando a(s) equação(ões) de equilíbrio relevante(s) para esse sistema tampão.

Problema de análise de dados

38. Surfactantes “reversíveis” Moléculas hidrofóbicas não se dissolvem bem em água. Dado que a água é um solvente muito comum, isso torna alguns processos muito difíceis: retirar o resíduo oleoso de alimentos dos pratos, limpar óleo derramado, manter as fases oleosa e aquosa das saladas bem

misturadas e fazer reações químicas que envolvam componentes hidrofílicos e hidrofóbicos.

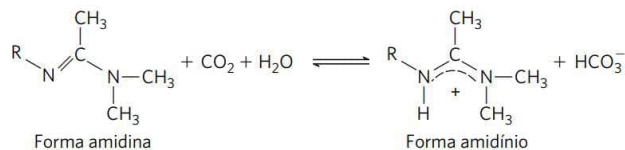
Surfactantes são uma classe de compostos anfipáticos que incluem sabões, detergentes e emulsificantes. Com o uso de surfactantes, compostos hidrofóbicos podem ser suspensos em soluções aquosas pela formação de micelas (ver Figura 2-7). Uma micela tem um núcleo hidrofóbico consistindo em compostos hidrofóbicos e as “caudas” hidrofóbicas do surfactante; as “cabeças” hidrofílicas do surfactante cobrem a superfície da micela. Uma suspensão de micelas é chamada de emulsão. Quanto mais hidrofílico o grupo que compõe a cabeça do surfactante, mais poderoso ele é, ou seja, maior a sua capacidade de emulsificar material hidrofóbico.

Quando se utiliza sabão para remover a gordura de pratos sujos, o sabão forma uma emulsão com a gordura, facilmente removida pela água por meio das interações das moléculas de água com a cabeça hidrofílica das moléculas de sabão. Da mesma forma, um detergente pode ser usado para emulsificar óleo derramado para a remoção com água. E emulsificantes em molhos industrializados de saladas mantêm o óleo suspenso na mistura à base de água.

Existem algumas situações nas quais seria muito útil ter um surfactante “reversível”: uma molécula que poderia ser reversivelmente convertida nas formas surfactante e não surfactante.

- (a) Imagine que esse surfactante reversível exista: como esse produto poderia ser usado para limpar um derramamento de óleo e depois recuperar o óleo?

Liu e colaboradores descrevem um protótipo de surfactante reversível no artigo de 2006 “surfactantes reversíveis”. A reversibilidade é baseada na seguinte reação:

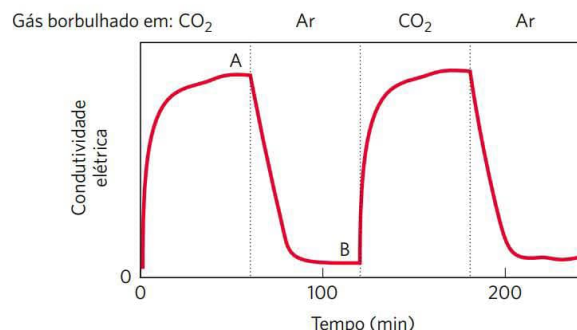


- (b) Dado que o $\text{p}K_a$ de um íon amidínio típico é 12,4, em qual direção (esquerda ou direita) você esperaria que o equilíbrio da reação acima se deslocasse? (Ver na Figura 2-16 os valores de $\text{p}K_a$ relevantes.) Justifique sua resposta. Dica: Lembrar a reação $\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3$.

Liu e colaboradores produziram um surfactante reversível no qual $\text{R} = \text{C}_{16}\text{H}_{33}$. Eles não deram nenhum nome à molécula no artigo, sendo aqui chamada de s-surf.

- (c) A forma amidínio do s-surf é um surfactante poderoso; a amidina não o é. Explique essa observação.

Liu e colaboradores descobriram que poderiam reverter entre as duas formas do s-surf pela mudança do gás que eles borbulhavam através de uma solução do surfactante. Eles demonstraram essa mudança pela medida da condutividade elétrica da solução de s-surf; soluções aquosas de compostos iônicos apresentam maior condutividade que soluções de compostos não iônicos. Eles começaram com uma solução da forma amidina do s-surf em água. Seus resultados estão demonstrados a seguir; as linhas tracejadas indicam a mudança do gás usado.



- (d) Em qual forma a maior parte do s-surf encontra-se no ponto A? E no ponto B?
- (e) Por que a condutividade elétrica aumenta do tempo 0 ao ponto A?
- (f) Por que a condutividade elétrica decresceu do ponto A para o ponto B?
- (g) Explique como o s-surf poderia ser usado para limpar e recuperar óleo de um derramamento de óleo.

Referência

Y. Liu, P.G. Jessop, M. Cunningham, C.A. Eckert e C.L. Liotta. 2006. Switchable surfactants. *Science* 313:958–960.

Esta página foi deixada em branco intencionalmente.

Aminoácidos, peptídeos e proteínas

- 3.1 Aminoácidos 75
- 3.2 Peptídeos e proteínas 85
- 3.3 Trabalhando com proteínas 89
- 3.4 Estrutura das proteínas: estrutura primária 96

As proteínas controlam praticamente todos os processos que ocorrem em uma célula, e elas apresentam uma variedade quase infinita de funções. Para explorar os mecanismos moleculares dos processos biológicos, os bioquímicos estudam quase que inevitavelmente uma ou mais proteínas. As proteínas são as macromoléculas biológicas mais abundantes, estando presentes em todas as células e em todas as partes das células. Além disso, há uma grande diversidade de proteínas; milhares de tipos diferentes podem ser encontrados em uma única célula. Como árbitros da função molecular, as proteínas são os produtos finais mais importantes das vias de informação discutidas na Parte III deste livro. As proteínas são os instrumentos moleculares pelos quais a informação genética é expressa.

A estrutura de um conjunto de monômeros simples é a chave para entender a estrutura de todas as milhares de proteínas diferentes. As proteínas de cada organismo, desde a mais simples das bactérias até os seres humanos, são construídas a partir do mesmo conjunto de 20 aminoácidos. Como cada um desses aminoácidos tem uma cadeia lateral com propriedades químicas específicas, esse grupo de 20 moléculas precursoras pode ser considerado o alfabeto no qual a linguagem da estrutura proteica está escrita.

Para gerar uma determinada proteína, os aminoácidos ligam-se de modo covalente em uma sequência linear específica. O mais marcante é que as células produzem proteínas com propriedades e atividades completamente diferentes, ligando os mesmos 20 aminoácidos em combinações e sequências muito diferentes. A partir desses blocos de construção, os diferentes organismos podem gerar produtos tão diversos como enzimas, hormônios, anticorpos, transportadores, fibras musculares, proteínas do cristalino dos olhos, penas, teias de aranha, chifres de rinocerontes, proteínas do leite, antibióticos, venenos de cogumelos e uma ampla variedade de outras substâncias com atividades biológicas as mais diversas (**Figura 3-1**). Entre as proteínas, as enzimas são as que têm maior variedade e especializações. Como catalisadoras de quase todas as reações celulares, as enzimas são uma das chaves para compreender

a química da vida e, assim, são um dos pontos centrais para qualquer curso de bioquímica.

A estrutura e a função das proteínas é o assunto deste e dos próximos três capítulos. Inicialmente, é apresentada uma descrição das propriedades químicas fundamentais dos aminoácidos, dos peptídeos e das proteínas. Também é abordado como os bioquímicos trabalham com proteínas.

3.1 Aminoácidos

Proteínas são polímeros de aminoácidos, com cada **resíduo de aminoácido** unido ao seu vizinho por um tipo específico de ligação covalente (o termo “resíduo” indica a perda de elementos de água quando um aminoácido é unido a outro). As proteínas podem ser degradadas (hidrolisadas) em seus aminoácidos constituintes por vários métodos. Os primeiros estudos sobre as proteínas, naturalmente, concentraram-se nos aminoácidos livres que fazem parte das proteínas. Vinte aminoácidos diferentes são comumente encontrados nas proteínas. O primeiro a ser descoberto foi a asparagina, em 1806. O último dos 20 a ser descoberto (treonina) não havia sido identificado até 1938. Todos os aminoácidos têm nomes comuns ou triviais, em alguns casos derivados da fonte da qual foram isolados pela primeira vez. A asparagina foi descoberta pela primeira vez no aspargo, e o glutamato, no glúten do trigo; a tirosina foi isolada pela primeira vez a partir do queijo (seu nome é derivado do grego, *tyros*, “queijo”); e a glicina (do grego, *glykos*, “doce”) recebeu esse nome devido ao seu sabor adocicado.

Os aminoácidos possuem algumas características estruturais em comum

Todos os 20 tipos de aminoácidos comuns são α -aminoácidos. Eles têm um grupo carboxila e um grupo amino ligados ao mesmo átomo de carbono (o carbono α) (**Figura 3-2**). Eles diferem uns dos outros quanto à cadeia lateral, ou **grupos R**, que varia em estrutura, tamanho e carga elétrica e afeta a solubilidade dos aminoácidos em água. Além desses 20 aminoácidos, há muitos outros menos comuns. Alguns têm a cadeia lateral modificada após a síntese proteica; outros aminoácidos estão presentes nos seres vivos, mas não como constituintes de proteínas. Aos aminoácidos comuns das proteínas foram atribuídas abreviações de três letras e símbolos de uma letra (Tabela 3-1). Essas abreviaturas são utilizadas para indicar a composição e a sequência de aminoácidos polimerizados em proteínas.



FIGURA 3-1 Algumas funções das proteínas. **(a)** A luz produzida por vaga-lumes é o resultado de uma reação envolvendo a proteína luciferina e o ATP, catalisada pela enzima luciferase (ver Quadro 13-1). **(b)** Os eritrócitos contêm grandes quantidades da proteína transportadora de oxigênio hemoglobina. **(c)** A proteína queratina, produzida por todos os vertebrados, é o componente estrutural principal de pelos, escamas, chifres, lâ, unhas e penas. O rinoceronte preto está muito próximo de ser extinto no seu ambiente natural devido à crença que há em algumas partes do mundo de que o pó do seu chifre tem propriedades afrodisíacas. Na verdade, as propriedades químicas do pó de chifre de rinoceronte não são diferentes daquelas do pó dos cascos de bovinos e das unhas das pessoas. [Fontes: (a) Jeff J. Daly/Alamy. (b) Bill Longcore/Science Source. (c) Mary Cooke/Animals.]

» **Convenção-chave:** o código de três letras é bastante evidente; as abreviações em geral consistem nas três primeiras letras do nome do aminoácido. O código de uma letra foi concebido por Margaret Oakley Dayhoff, considerada por muitos a fundadora do campo da bioinformática. O código de uma letra é o reflexo de uma tentativa de reduzir o tamanho dos arquivos de dados (na época da computação com cartões perfurados) utilizados para descrever as sequências de aminoácidos. Esse código foi desenvolvido para ser facilmente memorizado e saber como foi originado ajuda os estudantes a lembrar. No caso de seis aminoácidos (CHIMSV), a primeira letra do nome do aminoácido é única e, portanto, utilizada como o símbolo. Para cinco outros (AGLPT), a primeira letra não é única, mas foi dada ao aminoácido mais comum nas proteínas (p. ex., leucina é mais comum do que lisina). Para outros quatro, a letra utilizada é foneticamente sugestiva (RFYW: aRginina, Fenilalanina, tirosina [do inglês, *tYrosine*], triptofano [do inglês, *tWiptophan*]). Os outros foram mais difíceis de abreviar. Para quatro aminoácidos (DNEQ), foram atribuídas letras encontradas em seus nomes ou sugeridas pelos nomes (aspartato [do inglês, *asparDic*], asparagiNa, glutamato [do inglês, *glutamEke*], glutamina [do inglês, *Q-tamine*]). Faltava a lisina. Sobravam poucas letras no alfabeto, e a letra K foi escolhida porque era a mais próxima de L. «

Em todos os aminoácidos comuns, exceto na glicina, o carbono α está ligado a quatro grupos diferentes: um grupo carboxila, um grupo amino, um grupo R e um átomo de hidrogênio.

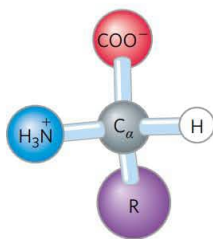


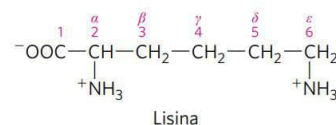
FIGURA 3-2 Estrutura geral de um aminoácido. Esta estrutura é comum a todos os tipos de α -aminoácidos, exceto um (a prolina, um aminoácido cíclico, é a exceção). Cada aminoácido tem um grupo R, ou cadeia lateral (em roxo), ligado ao carbono α (em cinza) diferente.



Margaret Oakley Dayhoff,
1925-1983

drogênio (Figura 3-2; na glicina, o grupo R é outro átomo de hidrogênio). O átomo de carbono α é, portanto, um **centro quiral** (p. 17). Em decorrência do arranjo tetraédrico dos orbitais de ligação em volta do átomo de carbono α , os quatro grupos diferentes podem ocupar dois arranjos espaciais únicos e, portanto, os aminoácidos têm dois estereoisômeros possíveis. Uma vez que elas são imagens espaciais não sobreponíveis uma da outra (Figura 3-3), as duas formas representam uma classe de estereoisômeros, denominada **enantiômeros** (ver Figura 1-21). Todas as moléculas com um centro quiral também são **opticamente ativas** – isto é, elas giram o plano da luz polarizada (ver Quadro 1-2).

» **Convenção-chave:** duas convenções são utilizadas para identificar os carbonos em um aminoácido – prática que pode ser confusa. Os carbonos adicionais em um grupo R são comumente denominados β , γ , δ , ϵ , e assim por diante, a partir do carbono α . Para a maioria das outras moléculas orgânicas, os átomos de carbono são simplesmente numerados a partir de uma das extremidades, dando preferência (C-1) ao carbono com o substituinte contendo o átomo de maior número atômico. Nessa última convenção, o carbono carboxílico de um aminoácido seria o C-1 e o carbono α seria o C-2.



Algumas vezes, como no caso dos aminoácidos com grupos R heterocíclicos (como a histidina), o sistema de letras gregas é ambíguo e usa-se a convenção numérica. No caso dos aminoácidos com cadeias laterais ramificadas, os carbonos que se equivalem recebem números após as letras gregas. A leucina, portanto, tem carbonos $\delta 1$ e $\delta 2$ (ver estrutura na Figura 3-5). «

TABELA 3-1 Propriedades e convenções associadas aos aminoácidos presentes nas proteínas

Aminoácido	Abreviação/ símbolo	M_r^a	Valores de pK_a			pI	Índice de hidropatia ^b	Ocorrência em proteínas (%) ^c
			pK_1 (—COOH)	pK_2 (—NH ₃ ⁺)	pK_R (grupo R)			
Grupos R alifáticos, apolares								
Glicina	Gly G	75	2,34	9,60		5,97	−0,4	7,2
Alanina	Ala A	89	2,34	9,69		6,01	1,8	7,8
Prolina	Pro P	115	1,99	10,96		6,48	−1,6 ^d	5,2
Valina	Val V	117	2,32	9,62		5,97	4,2	6,6
Leucina	Leu L	131	2,36	9,60		5,98	3,8	9,1
Isoleucina	Ile I	131	2,36	9,68		6,02	4,5	5,3
Metionina	Met M	149	2,28	9,21		5,74	1,9	2,3
Grupos R aromáticos								
Fenilalanina	Phe F	165	1,83	9,13		5,48	2,8	3,9
Tirosina	Tyr Y	181	2,20	9,11	10,07	5,66	−1,3	3,2
Triptofano	Trp W	204	2,38	9,39		5,89	−0,9	1,4
Grupos R polares, não carregados								
Serina	Ser S	105	2,21	9,15		5,68	−0,8	6,8
Treonina	Thr T	119	2,11	9,62		5,87	−0,7	5,9
Cisteína ^e	Cys C	121	1,96	10,28	8,18	5,07	2,5	1,9
Asparagina	Asn N	132	2,02	8,80		5,41	−3,5	4,3
Glutamina	Gln Q	146	2,17	9,13		5,65	−3,5	4,2
Grupos R carregados positivamente								
Lisina	Lys K	146	2,18	8,95	10,53	9,74	−3,9	5,9
Histidina	His H	155	1,82	9,17	6,00	7,59	−3,2	2,3
Arginina	Arg R	174	2,17	9,04	12,48	10,76	−4,5	5,1
Grupos R carregados negativamente								
Aspartato	Asp D	133	1,88	9,60	3,65	2,77	−3,5	5,3
Glutamato	Glu E	147	2,19	9,67	4,25	3,22	−3,5	6,3

^aOs valores de M_r refletem as estruturas como mostradas na Figura 3-5. Os elementos da água (M_r 18) são removidos quando o aminoácido é incorporado a um polipeptídeo.

^bEscala combinando hidrofobicidade e hidrofiliidade dos grupos R. Os valores refletem a energia livre (ΔG) da transferência da cadeia lateral do aminoácido de um solvente hidrofóbico para a água. Essa transferência é favorável ($\Delta G < 0$; índice com valor negativo) para aminoácidos de cadeia carregada ou polar, e desfavorável ($\Delta G > 0$; índice com valor positivo) para aminoácidos com cadeias laterais não polares ou mais hidrofóbicas. Ver Capítulo 11. [Fonte: J. Kyte e R. F. Doolittle, *J. Mol. Biol.* 157:105, 1982.]

^cMédia da ocorrência em mais de 1.150 proteínas. Fonte: R. F. Doolittle, em *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation* (G. D. Fasman, ed.), p. 599, Plenum Press, 1989.

^dNa sua concepção original, o índice de hidropatia leva em consideração a frequência com que cada resíduo de aminoácido aparece na superfície das proteínas. Como a prolina geralmente aparece na superfície fazendo parte de curvas em β , ela tem um *score* menor do que o sugerido pelo grupo metileno da cadeia lateral.

^eEm geral, a cisteína é classificada como polar, apesar de apresentar um índice hidropático positivo. Isso reflete a capacidade do grupo sulfidril de atuar como ácido fraco e formar com o oxigênio ou o nitrogênio uma ligação de hidrogênio fraca.

Uma nomenclatura especial foi desenvolvida para especificar a **configuração absoluta** dos quatro substituintes dos átomos de carbono assimétricos. As configurações absolutas de açúcares simples e de aminoácidos são especificadas pelo sistema **D e L** (**Figura 3-4**), com base na configuração absoluta do açúcar de três carbonos gliceraldeído. Essa convenção foi proposta por Emil Fischer em

1891. (Fischer sabia que grupos circundavam o carbono assimétrico do gliceraldeído, mas teve de supor a configuração absoluta; ele supôs corretamente, como foi confirmado posteriormente por análises de difração de raios x.) Em todos os compostos quirais, os estereoisômeros que têm uma configuração relacionada com a configuração do L-gliceraldeído são denominados L, e os estereoisôme-

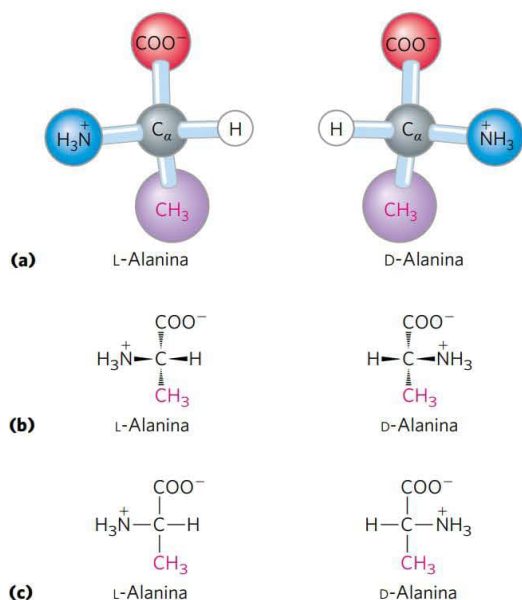


FIGURA 3-3 Estereoisomeria em α -aminoácidos. (a) Os dois estereoisômeros da alanina, L e D-alanina, são imagens especulares não sobreponíveis um do outro (enantiômeros). (b, c) Duas convenções diferentes para representar as configurações espaciais dos estereoisômeros. Em fórmulas de perspectiva (b), as ligações sólidas em forma de cunha projetam-se para fora do plano do papel, e as ligações tracejadas, para trás do plano. Em fórmulas de projeção (c), supõe-se que as ligações horizontais se projetam para a frente do plano do papel, e as ligações verticais, para trás. Entretanto, fórmulas de projeção muitas vezes são usadas casualmente e nem sempre pretendem representar uma configuração estereoquímica específica.

ros relacionados com o D-gliceraldeído são denominados D. Os grupos funcionais da L-alanina correspondem aos do L-gliceraldeído, uma vez que, para alinhá-los, eles devem ser interconvertidos por uma reação simples de etapa única. Portanto, o grupo carboxila de L-alanina ocupa

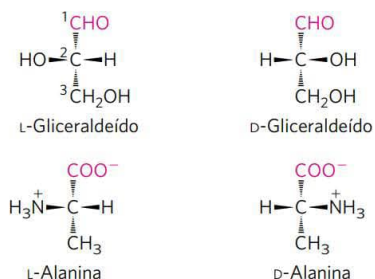


FIGURA 3-4 Relação estérica dos estereoisômeros de alanina à configuração absoluta do L-gliceraldeído e do D-gliceraldeído. Nestas fórmulas em perspectiva, os carbonos são alinhados verticalmente, com o átomo quiral no centro. Os carbonos nestas moléculas são numerados de 1 a 3, de cima para baixo, começando com o carbono do aldeído ou carboxiterminal (em vermelho), como mostrado. Quando representado dessa maneira, o grupo R do aminoácido (neste caso, o grupo metila da alanina) sempre fica abaixo do carbono α . Os L-aminoácidos são aqueles com o grupo α -amino à esquerda, e os D-aminoácidos têm o grupo α -amino à direita.

a mesma posição ao redor do carbono quiral que o grupo aldeído de L-gliceraldeído, visto que um aldeído é prontamente convertido em um grupo carboxila por meio de uma oxidação de etapa única. Historicamente, designações L e D semelhantes eram utilizadas para levorrotatória (rotação da luz polarizada à esquerda) e dextrorrotatória (rotação da luz polarizada à direita). Entretanto, nem todos os L-aminoácidos são levorrotatórios, e a convenção mostrada na Figura 3-4 é necessária para evitar potenciais ambiguidades sobre a configuração absoluta. Pela convenção de Fischer, L e D referem-se *apenas* à configuração absoluta dos quatro substituintes em torno do carbono quiral, e não às propriedades ópticas da molécula.

Outro sistema para especificar a configuração ao redor de um centro quiral é o **sistema RS**, utilizado na nomenclatura sistemática da química orgânica para descrever, com mais exatidão, a configuração das moléculas com mais de um centro quiral (p. 19).

Os resíduos de aminoácidos em proteínas são estereoisômeros L

Quase todos os compostos biológicos com centro quiral ocorrem naturalmente em apenas uma forma estereoisomérica, ou D ou L. Os resíduos de aminoácidos presentes nas moléculas de proteínas são exclusivamente isômeros L. Os resíduos de D-aminoácidos foram encontrados apenas em alguns peptídeos, geralmente pequenos, incluindo alguns peptídeos de paredes celulares de bactérias e certos antibióticos peptídicos.

É impressionante que praticamente todos os resíduos de aminoácidos em proteínas sejam estereoisômeros L. Quando compostos quirais são formados em reações químicas comuns, o resultado é uma mistura racêmica de isômeros D e L e, para os químicos, é difícil distinguir e separar um do outro. No entanto, para os sistemas vivos, os isômeros D e L são tão diferentes entre si quanto a mão direita é diferente da esquerda. A formação de subestruturas repetidas estáveis em proteínas (Capítulo 4) geralmente exige que os aminoácidos constituintes sejam de uma mesma série estereoquímica. As células são capazes de sintetizar especificamente os isômeros L de aminoácidos porque os sítios ativos de enzimas são assimétricos, tornando estereoespecíficas as reações por elas catalisadas.

Os aminoácidos podem ser classificados pelo grupo R

O conhecimento das propriedades químicas dos aminoácidos comuns é fundamental para compreender a bioquímica. Isso pode ser simplificado agrupando-se os aminoácidos em cinco classes principais com base nas propriedades dos grupos R (Tabela 3-1), particularmente a **polaridade** ou tendência para interagir com a água em pH biológico (próximo do pH 7,0). A polaridade dos grupos R varia amplamente, de apolar e hidrofóbico (não hidrossolúvel) a altamente polar e hidrofílico (hidrossolúvel). Alguns aminoácidos são mais difíceis de classificar ou não se encaixam perfeitamente em nenhum do grupo, principalmente glicina, histidina e cisteína. A inclusão em um determinado grupo é o resultado de avaliações ponderadas, em vez de absolutas.

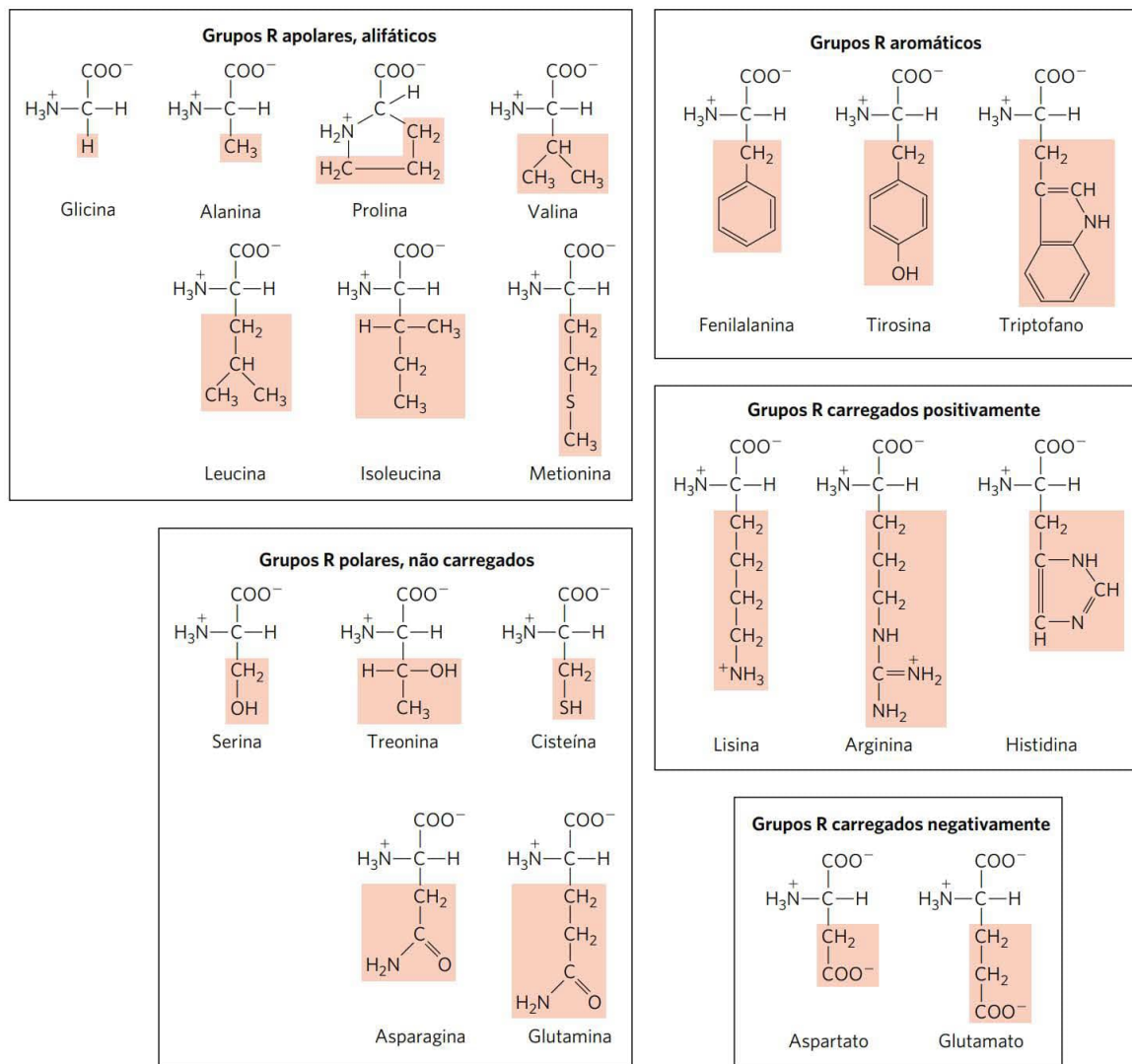


FIGURA 3-5 Os 20 aminoácidos comuns das proteínas. As fórmulas estruturais mostram o estado de ionização que predomina em pH 7,0. As partes não sombreadas são aquelas comuns a todos os aminoácidos; as sombreadas são os grupos R. Embora o grupo R da histidina esteja mostrado sem carga, seu pK_a (ver Tabela 3-1) é tal que uma pequena, mas significativa, fração desses grupos está carregada positivamente em pH 7,0. A forma protonada da histidina está mostrada na parte de cima do gráfico da Figura 3-12b.

As estruturas dos 20 aminoácidos comuns estão mostradas na **Figura 3-5** e algumas de suas propriedades estão listadas na Tabela 3-1. Em cada classe há graduações de polaridade, tamanho e forma dos grupos R.

Grupos R apolares, alifáticos Os grupos R nesta classe de aminoácidos são apolares e hidrofóbicos. As cadeias laterais de **alanina**, **valina**, **leucina** e **isoleucina** tendem a se agrupar no interior das proteínas, estabilizando a estrutura proteica por meio de interações hidrofóbicas. A **glicina** tem a estrutura mais simples. Embora seja mais facilmente agrupada junto com os aminoácidos apolares, sua cadeia lateral muito pequena não contribui efetivamente para interações hidrofóbicas. A **metionina**, um dos dois aminoácidos que contêm enxofre, tem um grupo tioéter ligeiramente apolar em sua cadeia lateral. A **prolina** tem cadeia lateral alifáti-

ca com estrutura cíclica distinta. O grupo amino secundário (imino) do resíduo de prolina é mantido em uma configuração rígida que reduz a flexibilidade estrutural das regiões polipeptídicas que contêm prolina.

Grupos R aromáticos **Fenilalanina**, **tirosina** e **triptofano**, com cadeias laterais aromáticas, são relativamente apolares (hidrofóbicos). Todos podem contribuir para o efeito hidrofóbico. O grupo hidroxila da tirosina pode formar ligações de hidrogênio e é um grupo funcional importante em algumas enzimas. A tirosina e o triptofano são significativamente mais polares do que a fenilalanina, devido ao grupo hidroxila da tirosina e ao nitrogênio do anel indol do triptofano.

O triptofano, a tirosina e, em menor extensão, a fenilalanina absorvem a luz ultravioleta (**Figura 3-6**; ver também

QUADRO 3-1 MÉTODOS Absorção de luz por moléculas: a lei de Lambert-Beer

Muitas biomoléculas absorvem luz em comprimentos de onda característicos, como é o caso do triptofano, que absorve a luz em 280 nm (ver Figura 3-6). Medir a absorção da luz usando um espectrofotômetro é útil para detectar e identificar moléculas e também para determinar as respectivas concentrações em soluções. A fração da luz incidente absorvida por uma solução em um determinado comprimento de onda está relacionada à espessura da camada de absorção (comprimento do caminho óptico) e à concentração da substância que absorve (Figura 1). Essas duas relações são combinadas na lei de Lambert-Beer,

$$\log \frac{I_0}{I} = \epsilon cl$$

em que I_0 é a intensidade da luz incidente, I é a intensidade da luz transmitida, a relação I/I_0 (o inverso da razão na equação) é a transmitância, ϵ é o coeficiente de extinção molar (em unidades de litros por mol por centímetro), c é a concentração da substância que absorve luz (em

moles por litro) e l é o comprimento do caminho de luz da amostra absorvente de luz (em centímetros). A lei de Lambert-Beer pressupõe que a luz incidente é paralela e monocromática (de um único comprimento de onda) e que a orientação das moléculas de solvente e soluto é aleatória. A expressão $\log(I_0/I)$ é denominada **absorbância** e representada por A .

É importante observar que cada milímetro sucessivo do comprimento do caminho da luz na solução absorvente em uma célula de 1,0 cm não absorve uma quantidade constante, mas uma fração constante da luz que incide sobre ela. Entretanto, mantendo fixo o comprimento do caminho óptico, a **absorbância**, A , é **diretamente proporcional à concentração do soluto absorvente**.

O coeficiente de extinção molar varia com a natureza do composto absorvente, do solvente e do comprimento de onda, e também com o pH, caso a substância que absorve a luz esteja em equilíbrio com um estado de ionização que tenha propriedades de absorção diferentes.

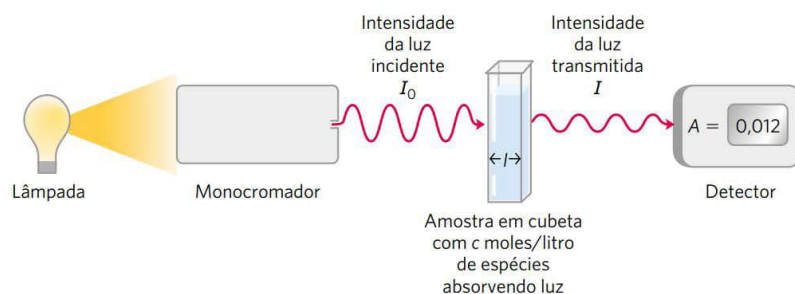


FIGURA Q-1 Os principais componentes de um espectrofotômetro. Uma fonte de luz emite luz em um amplo espectro e o monocromador seleciona e transmite apenas luz de um comprimento de onda específico. A luz monocromática passa através da amostra em uma cubeta com um comprimento. A absorbância da amostra, $\log(I_0/I)$, é proporcional à concentração das espécies que absorvem luz. A luz transmitida é medida em um detector.

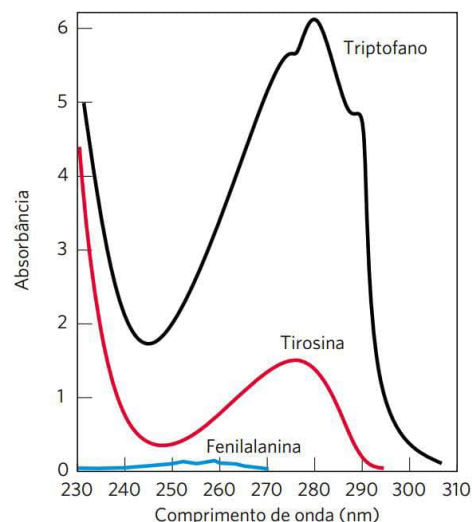
Quadro 3-1). Isso explica a característica da maior parte das proteínas de absorverem fortemente luz com comprimento de onda de 280 nm, propriedade explorada por pesquisadores para caracterizar proteínas.

Grupos R polares, não carregados Os grupos R desses aminoácidos são mais solúveis em água, ou mais hidrofílicos do que aqueles dos aminoácidos apolares, uma vez que contêm grupos funcionais que formam ligações de hidrogênio com a água. Essa classe de aminoácidos inclui **serina, treonina, cisteína, asparagina e glutamina**. Os grupos hidroxila da serina e da treonina e os grupos amida da asparagina e da glutamina contribuem para as suas polaridades. A cisteína é um caso isolado porque a sua polaridade, devida ao grupo sulfidril, é relativamente pequena. A cisteína é um

ácido fraco e pode fazer ligações de hidrogênio fracas com oxigênio ou nitrogênio.

A asparagina e a glutamina são as amidas de outros dois aminoácidos também encontrados em proteínas, aspartato

FIGURA 3-6 Absorção da luz ultravioleta por aminoácidos aromáticos. Comparação dos espectros de absorção de luz dos aminoácidos aromáticos triptofano, tirosina e fenilalanina em pH 6,0. Os aminoácidos estão presentes em quantidades equimolares (10^{-3} M) e sob condições idênticas. A absorbância medida do triptofano é mais de quatro vezes maior do que aquela da tirosina, no comprimento de onda 280 nm. Observe que para triptofano e tirosina a absorção máxima de luz ocorre próxima de 280 nm. A absorção de luz pela fenilalanina geralmente contribui pouco para as propriedades espectroscópicas das proteínas.



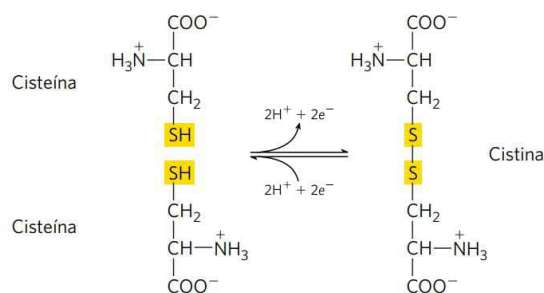


FIGURA 3-7 Formação reversível de uma ligação dissulfeto pela oxidação de duas moléculas de cisteína. Ligações dissulfeto entre resíduos Cys estabilizam as estruturas de muitas proteínas.

e glutamato, respectivamente. Elas são facilmente hidrolisadas por ácido ou base, produzindo aspartato e glutamato. A cisteína é facilmente oxidada para formar um aminoácido dimérico ligado de modo covalente, chamado de **cistina**, e formado por duas moléculas ou resíduos de cisteína ligadas por uma ligação dissulfeto (**Figura 3-7**). Resíduos ligados por dissulfeto são fortemente hidrofóbicos (apolares). As ligações dissulfeto desempenham um papel especial nas estruturas de muitas proteínas pela formação de ligações covalentes entre partes de uma molécula polipeptídica ou entre duas cadeias polipeptídicas diferentes.

Grupos R carregados positivamente (básicos) Os grupos R mais hidrofílicos são aqueles carregados positiva ou negativamente. Os aminoácidos que possuem grupos R com uma carga positiva significativa em pH 7,0 são a **lisina**, com um segundo grupo amino primário na posição ϵ na sua cadeia alifática; a **arginina**, com um grupo guanidínio positivamente carregado; e a **histidina**, com um grupo aromático imidazol. Como o único aminoácido comum que tem uma cadeia lateral ionizável com pK_a próximo da neutralidade, o resíduo de histidina pode estar positivamente carregado (forma protonada) ou não carregado em pH 7,0. Resíduos de His facilitam muitas reações catalisadas por enzimas, funcionando como doadores/aceptores de prótons.

Grupos R carregados negativamente (ácidos) Os dois aminoácidos que apresentam grupos R com carga negativa líquida em pH 7,0 são o **aspartato** e o **glutamato**, cada um dos quais tem um segundo grupo carboxila.

Aminoácidos incomuns também têm funções importantes

Além dos 20 aminoácidos comuns, as proteínas podem conter resíduos criados por modificações de resíduos de aminoácidos que já foram incorporados em um polipeptídeo (**Figura 3-8a**). Entre esses aminoácidos incomuns estão a **4-hidroxiprolina**, derivada da prolina, e a **5-hidroxilisina**, derivada da lisina. A primeira é encontrada em proteínas da parede celular de células vegetais e esses dois aminoácidos são encontrados no colágeno, proteína fibrosa de tecidos conectivos. A **6-N-metil-lisina** é um constituinte da miosina, uma proteína contrátil do músculo. Outro aminoácido incomum importante é o **γ -carboxiglutamato**, encontrado na proteína de coagulação protrombina e em

algumas outras proteínas que se ligam ao Ca^{2+} como parte de suas funções biológicas. Mais complexa é a **desmosina**, derivada de quatro resíduos Lys, encontrada na proteína fibrosa elastina.

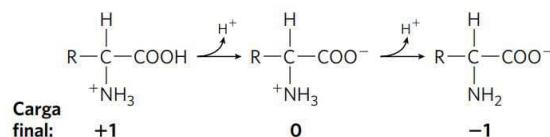
Selenocisteína e **pirrolisina** são casos especiais. Esses aminoácidos raros não são formados por um processo de modificação após a síntese peptídica. Em vez disso, eles são introduzidos durante a síntese proteica por meio de uma adaptação incomum do código genético, descrito no Capítulo 27. Selenocisteína contém selênio em vez do enxofre da cisteína. Um derivado de serina, a selenocisteína é um constituinte de apenas algumas poucas proteínas conhecidas. A pirrolisina é encontrada em poucas proteínas em algumas arqueias metalogênicas (produzem metano) e em apenas uma bactéria. Ela tem participação na biossíntese de metano.

Alguns resíduos de aminoácidos em uma proteína podem ser modificados transitoriamente para alterar as funções da proteína. A adição de grupos fosforila, metila, acetila, adenilila, ADP-ribosila ou outros grupos a resíduos de aminoácidos específicos pode aumentar ou diminuir a atividade de uma proteína (**Figura 3-8b**). A fosforilação é uma modificação reguladora particularmente comum. A modificação covalente como estratégia de regular a atividade de proteínas é discutida com mais detalhes no Capítulo 6.

Cerca de 300 aminoácidos adicionais foram encontrados nas células. Eles têm várias funções, mas nem todos fazem parte de proteínas. A **ornitina** e a **citrulina** (**Figura 3-8c**) merecem atenção especial porque são intermediários-chave (metabólitos) na biossíntese de arginina (Capítulo 22) e no ciclo da ureia (Capítulo 18).

Aminoácidos podem agir como ácidos e bases

Os grupos amino e carboxila dos aminoácidos, em conjunto com os grupos ionizáveis R de alguns aminoácidos, funcionam como ácidos e bases fracos. Quando um aminoácido sem um grupo R ionizável é dissolvido em água em pH neutro, ele permanece na solução como um íon bipolar, ou **zwitterion** (do alemão, “íon híbrido”), que pode agir como ácido ou base (**Figura 3-9**). Substâncias com essa natureza dupla (ácido-base) são **anfotéricas** e são frequentemente chamadas de **anfólitos** (derivado de “eletrólitos anfotéricos”). Um α -aminoácido monoamino e monocarboxílico, como a alanina, é um ácido diprótico quando completamente protonado; ele tem dois grupos (o grupo $-\text{COOH}$ e o grupo $-\text{NH}_3^+$) e pode produzir dois prótons:



Aminoácidos têm curvas de titulação características

A titulação ácido-base envolve a adição ou remoção gradual de prótons (Capítulo 2). A **Figura 3-10** mostra a curva de titulação de uma forma diprótica de glicina. Os dois grupos ionizáveis de glicina, o grupo carboxila e o grupo amino, são titulados com uma base forte, NaOH, por exemplo. O gráfico tem duas fases distintas, correspondendo à desprotonação

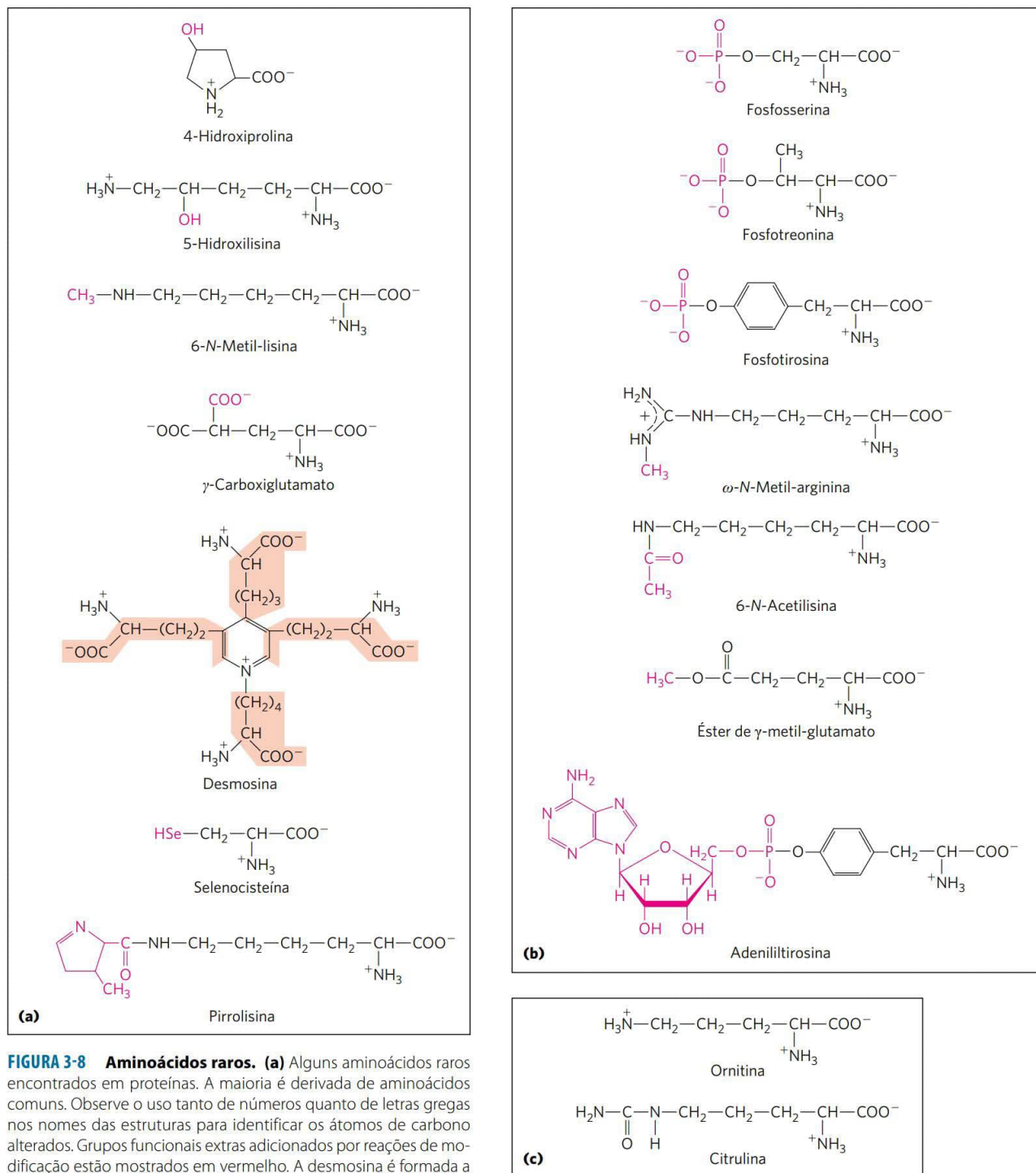


FIGURA 3-8 Aminoácidos raros. (a) Alguns aminoácidos raros encontrados em proteínas. A maioria é derivada de aminoácidos comuns. Observe o uso tanto de números quanto de letras gregas nos nomes das estruturas para identificar os átomos de carbono alterados. Grupos funcionais extras adicionados por reações de modificação estão mostrados em vermelho. A desmosina é formada a partir de quatro resíduos Lys (os esqueletos de carbono estão sombreados). Selenocisteína e pirrolisina são exceções; esses aminoácidos são adicionados durante a síntese proteica normal por meio de uma expansão especializada do código genético padrão, descrito no Capítulo 27. Eles são encontrados em um número muito pequeno de proteínas. **(b)** Modificações reversíveis de aminoácidos estão envolvidas na regulação da atividade proteica. A fosforilação é o tipo mais comum de modificação regulatória. **(c)** Ornitina e citrulina, não encontrados em proteínas, são intermediários na biossíntese de arginina e no ciclo da ureia.

de dois grupos diferentes da glicina. Cada uma das duas fases se assemelha ao formato da curva de titulação de um ácido monoprótico, como o ácido acético (ver Figura 2-17), e pode ser analisada do mesmo modo. Em pH muito baixo, a forma predominante da glicina é a forma totalmente protonada, $^+H_3N-CH_2-COOH$. No primeiro estágio da titulação, o grupo $-COOH$ da glicina perde o próton. No ponto médio

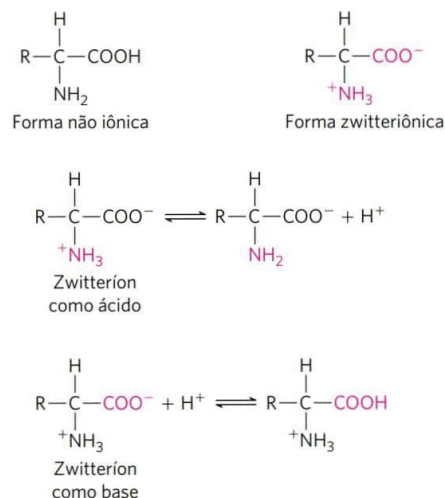


FIGURA 3-9 Formas não iônicas e zwitteriônicas de aminoácidos.

A forma não iônica não ocorre em quantidades significativas em soluções aquosas. O zwitterion predomina em pH neutro. Um zwitterion pode atuar tanto como ácido (doador de prótons) quanto como base (aceptor de prótons).

desse estágio estão presentes concentrações equimoleculares do doador de próton ($^+\text{H}_3\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOH}$) e do acceptor de próton ($^+\text{H}_3\text{N}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$). Como na titulação de qualquer ácido fraco, um ponto de inflexão é alcançado nesse ponto médio, onde o pH é igual ao pK_a do grupo protonado que está sendo titulado (ver Figura 2-18). Para a glicina, o pH no ponto médio é 2,34, portanto seu grupo $-\text{COOH}$ tem um pK_a (marcado pK_1 na Figura 3-10) de 2,34. (Lembre-se, do Capítulo 2, que pH e pK_a são simplesmente notações convenientes para a concentração de prótons e a constante de equilíbrio para ionização, respectivamente. O pK_a é uma medida da tendência de um grupo de doar um próton, e essa tendência diminui dez vezes cada vez que o pK_a aumenta em uma unidade.) À medida que a titulação da glicina prossegue, outro ponto importante é alcançado no pH 5,97. Aqui, há outro ponto de inflexão, no qual a remoção do primeiro próton está completa e a remoção do segundo apenas começou. Neste pH, a maior parte da glicina está presente como um íon dipolar (zwitterion) $^+\text{H}_3\text{N}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$. Em breve, o significado desse ponto de inflexão na curva de titulação será analisado brevemente (marcado como pI na Figura 3-10).

O segundo estágio da titulação corresponde à remoção de um próton do grupo $-\text{NH}_3^+$ da glicina. O pH no ponto médio dessa fase é 9,60, igual ao pK_a (marcado pK_2 na Figura 3-10) para o grupo $-\text{NH}_3^+$. A titulação fica completa em um pH de cerca de 12, no ponto em que a forma predominante de glicina é $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$.

A partir da curva de titulação da glicina, é possível obter várias informações importantes. Em primeiro lugar, ela fornece uma medida quantitativa do pK_a de cada um dos dois grupos ionizáveis: 2,34 para o grupo $-\text{COOH}$ e 9,60 para o grupo $-\text{NH}_3^+$. Observe que o grupo carboxila da glicina é mais de cem vezes mais ácido (mais facilmente ionizado) do que o grupo carboxila do ácido acético, que, como foi visto no Capítulo 2, tem um pK_a de 4,76 – próximo da mé-

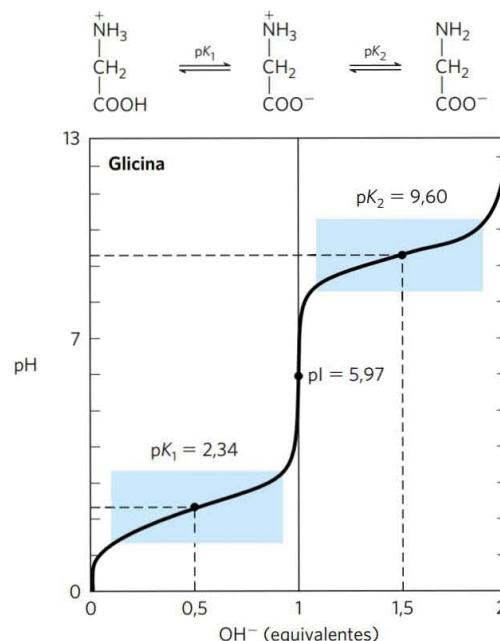


FIGURA 3-10 Titulação de um aminoácido. Curva de titulação de glicina 0,1 M a 25°C. As espécies iônicas predominantes nos pontos-chave da titulação estão mostradas na parte superior do gráfico. Os retângulos sombreados, centrados em torno de $\text{pK}_1 = 2,3$ e $\text{pK}_2 = 9,60$, indicam as regiões de maior poder tampão. Observe que 1 equivalente de $\text{OH}^- = 0,1$ M de NaOH adicionado.

dia para grupos carboxila ligados a hidrocarbonetos alifáticos não substituídos. Essa discrepância no pK_a da glicina é causada principalmente pela proximidade da carga positiva do grupo amino do carbono α , um grupo eletronegativo que tende a atrair elétrons em sua direção (processo denominado retirada de elétrons), descrito na Figura 3-11. As cargas opostas no zwitterion resultante estão estabilizadas. De modo semelhante, o pK_a do grupo amino da glicina diminui em relação ao pK_a médio de um grupo amino. Esse efeito se deve, em grande parte, à atração de elétrons pelos átomos de oxigênio altamente eletronegativos do grupo carboxila, o que aumenta a tendência do grupo amino de doar um próton. Assim, o grupo α -amino tem um pK_a menor do que o de uma amina alifática, como a metilamina (Figura 3-11). Em resumo, o pK_a de qualquer grupo funcional é muito afetado pelo ambiente químico em que se encontra. Esse fenômeno é explorado nos sítios ativos de algumas enzimas para proporcionar mecanismos de reação extraordinariamente adaptados. Esses mecanismos dependem da alteração nos valores de pK_a de grupos doadores/aceptores de prótons de resíduos específicos.

A segunda informação dada pela curva de titulação da glicina é que esse aminoácido tem duas regiões com poder de tampão. Uma delas está na parte relativamente achatada da curva, estendendo-se por aproximadamente 1 unidade de pH de cada lado do primeiro pK_a de 2,34, indicando que a glicina é um bom tampão próximo desse pH. A outra zona de tampão está centrada em volta de pH 9,60. (Observe que a glicina não é um bom tampão no pH do líquido intracelular ou do sangue, em torno de 7,4.)

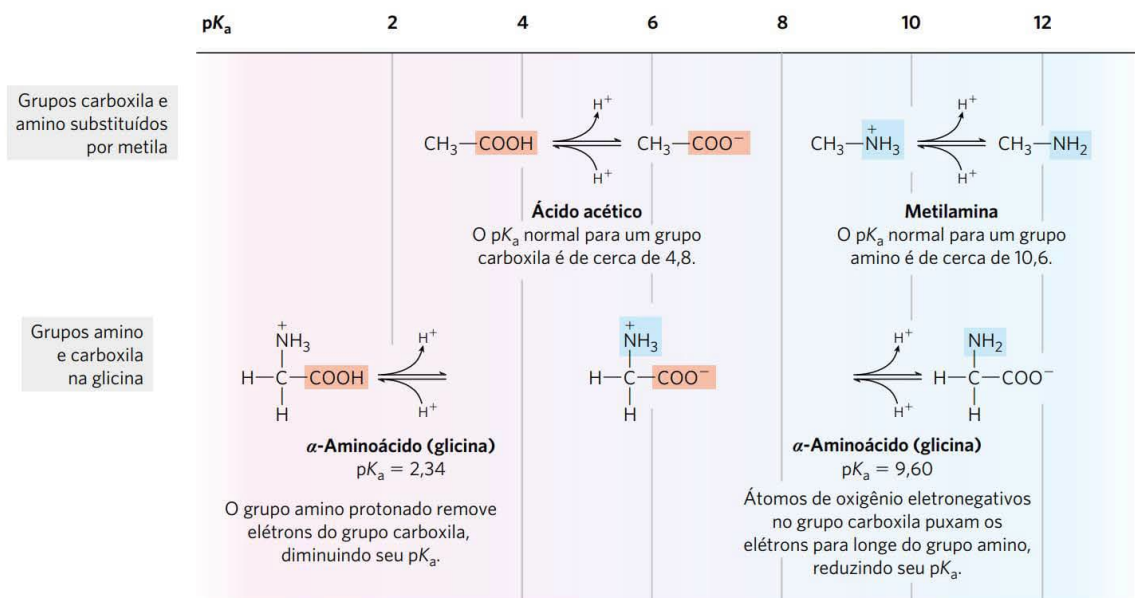


FIGURA 3-11 Efeito do ambiente químico sobre pK_a . Os valores de pK_a para os grupos ionizáveis na glicina são mais baixos do que aqueles dos grupos presentes em uma molécula simples formada pela substituição de um grupo carboxila ou amino em uma metila. Essas alterações no valor de pK_a se devem a interações intramoleculares. Efeitos semelhantes podem ser causados por grupos químicos que estejam posicionados próximos – por exemplo, no sítio ativo de uma enzima.

Dentro das faixas de tamponamento da glicina, a equação de Henderson-Hasselbalch (p. 65) pode ser utilizada para calcular as proporções das espécies de glicina doadoras e receptoras de prótons, necessárias para preparar um tampão em um determinado pH.

Curvas de titulação predizem a carga elétrica dos aminoácidos

Outra informação importante que se obtém da curva de titulação de um aminoácido é a relação entre a respectiva carga líquida e o pH da solução. Em 5,97, o ponto de inflexão entre os dois estágios da curva de titulação, a glicina está presente predominantemente na forma bipolar, totalmente ionizada, mas sem carga elétrica líquida (Figura 3-10). O pH característico, no qual a carga elétrica líquida é zero, é denominado **ponto isoelétrico** ou **pH isoelétrico**, designado por **pI**. Para a glicina, que não possui qualquer grupo ionizável na cadeia lateral, o ponto isoelétrico é simplesmente a média aritmética dos dois valores de pK_a :

$$pI = \frac{1}{2}(pK_1 + pK_2) = \frac{1}{2}(2,34 + 9,60) = 5,97$$

A Figura 3-10 deixa evidente que a glicina tem uma carga líquida negativa em qualquer pH acima do seu pI e, portanto, quando colocada em um campo elétrico, irá se deslocar em direção ao eletrodo positivo (o ânodo). Em qualquer pH abaixo do pI, a glicina tem uma carga final positiva e irá se deslocar em direção ao eletrodo negativo (o cátodo). Quanto mais distante o pH de uma solução de glicina estiver do ponto isoelétrico, maior será a carga elétrica líquida da população de moléculas de glicina. Em pH 1,0, por exemplo, a glicina está quase que exclusivamente na for-

ma $^+\text{H}_3\text{N—CH}_2\text{—COOH}$, tendo uma carga líquida de 1,0. Em pH 2,4, em que há uma mistura de partes iguais de $^+\text{H}_3\text{N—CH}_2\text{—COOH}$ e $^+\text{H}_3\text{N—CH}_2\text{—COO}^-$, a carga líquida positiva média é 0,5. O sinal e a magnitude da carga líquida de qualquer aminoácido em qualquer pH podem ser previstos de maneira semelhante.

Aminoácidos diferem em suas propriedades acidobásicas

As propriedades compartilhadas entre muitos aminoácidos permitem fazer algumas generalizações simplificadas sobre os respectivos comportamentos acidobásicos. Em primeiro lugar, todos os aminoácidos com apenas um grupo α -amino, apenas um grupo α -carboxila e um grupo R não ionizável têm curvas de titulação semelhantes à da glicina (Figura 3-10). Esses aminoácidos têm valores de pK_a muito semelhantes, mas não idênticos: o pK_a do grupo —COOH situa-se na faixa de 1,8 a 2,4, e o pK_a do grupo —NH_3^+ , na faixa de 8,8 a 11,0 (Tabela 3-1). As diferenças desses valores de pK_a refletem os ambientes químicos que são impostos pelos grupos R. Em segundo lugar, os aminoácidos com um grupo R ionizável têm curvas de titulação mais complexas, com três estágios que correspondem às três etapas possíveis de ionização; assim, eles possuem três valores de pK_a . O estágio adicional da titulação do grupo R ionizável se sobrepõe, em algum grau, com aquele da titulação do grupo α -carboxila, da titulação do grupo α -amino, ou com ambos. As curvas de titulação para dois aminoácidos desse grupo, glutamato e histidina, estão mostradas na Figura 3-12. Os pontos isoelétricos refletem a natureza dos grupos R ionizáveis presentes. Por exemplo, o glutamato tem um pI de 3,22, consideravelmente mais baixo do que o da glicina. Isso se deve à pre-

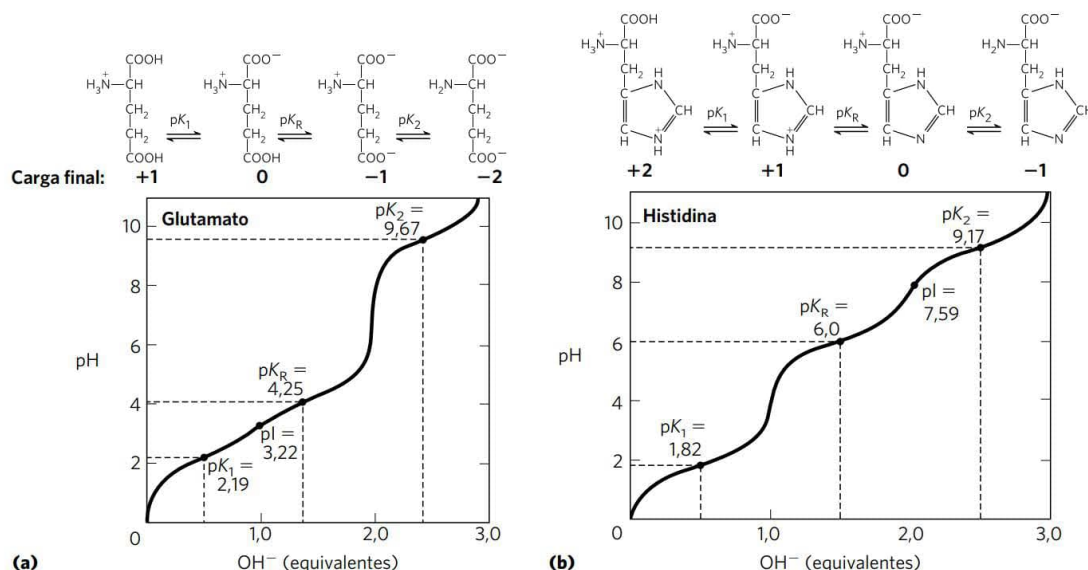


FIGURA 3-12 Curvas de titulação para (a) glutamato e (b) histidina. O pK_a do grupo R é designado aqui como pK_R .

sença de dois grupos carboxila, que, na média dos valores de pK_a (3,22), contribuem para uma carga líquida de -1 que equilibra a carga $+1$ proveniente do grupo amina. Do mesmo modo, o pI da histidina, com dois grupos positivamente carregados quando protonados, é de 7,59 (a média dos valores de pK_a dos grupos amina e imidazol), muito mais alto do que aquele da glicina.

Por fim, como ressaltado anteriormente, quando numa situação de exposição totalmente aberta ao ambiente aquoso, apenas a histidina tem um grupo R ($pK_a = 6,0$) e isso confere capacidade de tamponamento significativa em pH próximo do pH neutro normalmente encontrado nos líquidos intracelulares e extracelulares da maior parte dos animais e das bactérias (Tabela 3-1).

RESUMO 3.1 Aminoácidos

- Os 20 aminoácidos comumente encontrados como resíduos em proteínas contêm um grupo α -carboxila, um grupo α -amino e um grupo R característico substituído no átomo do carbono α . O átomo de carbono α de todos os aminoácidos, exceto a glicina, é assimétrico e, portanto, os aminoácidos podem existir em pelo menos duas formas estereoisoméricas. Apenas os estereoisômeros L (configuração relacionada à configuração absoluta da molécula de referência L-gliceraldeído) são encontrados em proteínas.
- Outros aminoácidos, menos comuns, também ocorrem, tanto como constituintes de proteínas (pela modificação de resíduos de aminoácidos comuns após a síntese proteica) quanto como metabólitos livres.
- Os aminoácidos podem ser classificados em cinco tipos com base na polaridade e na carga (em pH 7) dos seus grupos R.
- Os aminoácidos variam em suas propriedades acidobásicas e têm curvas de titulação características. Aminoá-

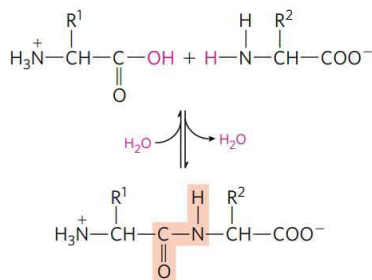
cidos monoamino monocarboxílicos (com grupos R não ionizáveis) são ácidos dipróticos ($^+H_3NCH(R)COOH$) em pH baixo e existem em várias formas iônicas diferentes à medida que o pH aumenta. Aminoácidos com grupos R ionizáveis têm espécies iônicas adicionais, dependendo do pH do meio e do pK_a do grupo R.

3.2 Peptídeos e proteínas

Agora o foco passa a ser os polímeros de aminoácidos, os **peptídeos** e as **proteínas**. Os polipeptídeos que ocorrem nos seres vivos variam muito em tamanho, desde pequenos a muito grandes, formados de dois ou três até milhares de resíduos de aminoácidos ligados um ao outro. As propriedades químicas fundamentais desses polímeros serão discutidas a seguir.

Peptídeos são cadeias de aminoácidos

Duas moléculas de aminoácidos podem ser ligadas por ligação covalente por meio de uma ligação amida substituída, denominada **ligação peptídica**, produzindo, assim, um dipeptídeo. Essa ligação é formada pela remoção de elementos de água (desidratação) do grupo α -carboxila de um aminoácido e do grupo α -amino do outro (Figura 3-13). A formação da ligação peptídica é um exemplo de uma reação de condensação, uma classe comum de reações nas células vivas. Em condições bioquímicas padrão, o equilíbrio para a reação mostrada na Figura 3-13 favorece os aminoácidos em relação ao dipeptídeo. Para tornar a reação mais favorável termodinamicamente, o grupo carboxila deve ser modificado ou ativado quimicamente, de modo que o grupo hidroxila possa ser eliminado mais facilmente. Uma abordagem química para esse problema será destacada posteriormente neste capítulo. A abordagem biológica para a formação das ligações peptídicas é o tópico principal do Capítulo 27.

**FIGURA 3-13** Formação da ligação peptídica por condensação.

O grupo α -amino de um aminoácido (com grupo R^2) atua como nucleófilo para deslocar o grupo hidroxila do outro aminoácido (com grupo R^1), formando uma ligação peptídica (sombreada). Os grupos amino são bons nucleófilos, mas o grupo hidroxila é um grupo de saída fraco e não é deslocado com facilidade. No pH fisiológico, a reação mostrada não ocorre em grau apreciável.

Três aminoácidos podem ser unidos por duas ligações peptídicas para formar um tripeptídeo; do mesmo modo, quatro aminoácidos podem ser unidos para formar um tetrapeptídeo, cinco para formar um pentapeptídeo, e assim por diante. Quando o número de aminoácidos que se ligam dessa maneira é pequeno, a estrutura é chamada de **oligopeptídeo**. Quando o número de aminoácidos que se ligam for maior, o produto é chamado de **polipeptídeo**. As proteínas podem ter milhares de resíduos de aminoácidos. Embora algumas vezes os termos “proteína” e “polipeptídeo” sejam usados de maneira intercambiável, as moléculas chamadas de polipeptídeos têm massas moleculares abaixo de 10.000, e as chamadas de proteínas têm massas moleculares mais elevadas.

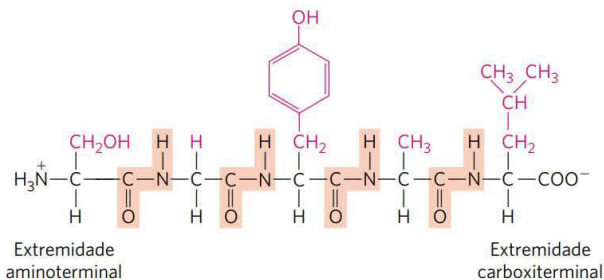
A **Figura 3-14** mostra a estrutura de um pentapeptídeo. Como foi observado anteriormente, uma unidade de aminoácido em um peptídeo é geralmente chamada de resíduo (a parte restante após a perda de elementos de água – um átomo de hidrogênio do grupo amino e a hidroxila do grupo carboxila). Em um peptídeo, o resíduo de aminoácido na extremidade com um grupo α -amino livre é chamado de resíduo **aminoterminal** (ou *N*-terminal); o resíduo na outra extremidade, que tem um grupo carboxila livre, é o resíduo **carboxiterminal** (*C*-terminal).

➤ **Convenção-chave:** quando se representa uma sequência de aminoácidos de um peptídeo, polipeptídeo ou proteína, a extremidade aminoterminal é colocada à esquerda, e a extremidade carboxiterminal, à direita. A sequência é lida da esquerda para a direita, começando com a extremidade aminoterminal. ◀◀

Embora a hidrólise de uma ligação peptídica seja uma reação exergônica, ela só ocorre lentamente porque tem uma elevada energia de ativação (p. 28). Como resultado, as ligações peptídicas em proteínas são muito estáveis, com meia-vida média ($t_{1/2}$) de cerca de 7 anos na maioria das condições intracelulares.

Pode-se diferenciar peptídeos pelos seus comportamentos de ionização

Peptídeos contêm apenas um grupo α -amino e um grupo α -carboxila livres, em extremidades opostas da cadeia

**FIGURA 3-14** O pentapeptídeo serilglicilতিরসিলানিলেউসিনা, Ser-Gly-Tyr-Ala-Leu, ou SGYAL.

Os peptídeos são denominados a partir do resíduo aminoterminal, que, por convenção, é colocado à esquerda. As ligações peptídicas estão sombreadas; os grupos R estão em cor-de-rosa.

(**Figura 3-15**). Esses grupos se ionizam do mesmo modo do que nos aminoácidos livres. Os grupos α -amino e α -carboxila de todos os aminoácidos não terminais estão ligados covalentemente nas ligações peptídicas, que não se ionizam e, portanto, não contribuem para o comportamento acidobásico total dos peptídeos. Entretanto, os grupos R de alguns aminoácidos podem se ionizar (Tabela 3-1) e, em um peptídeo, eles contribuem para as propriedades acidobásicas gerais da molécula (**Figura 3-15**). Assim, o comportamento acidobásico de um peptídeo pode ser previsto a partir dos seus grupos α -amino e α -carboxila livres em combinação com a natureza e o número de grupos R ionizáveis.

Como os aminoácidos livres, os peptídeos têm curvas de titulação características e um pH isoelétrico característico (pI), pH no qual ele não se desloca quando submetido a um campo elétrico. Essas propriedades são exploradas em algumas das técnicas utilizadas para separar peptídeos e proteínas, como será visto mais adiante neste capítulo. Deve ser enfatizado que o valor do pK_a de um grupo R ionizável pode se alterar um pouco quando um aminoácido passa a compor um peptídeo. A perda da carga nos grupos α -carboxila e α -amino, as interações com outros grupos R do peptídeo e outros fato-

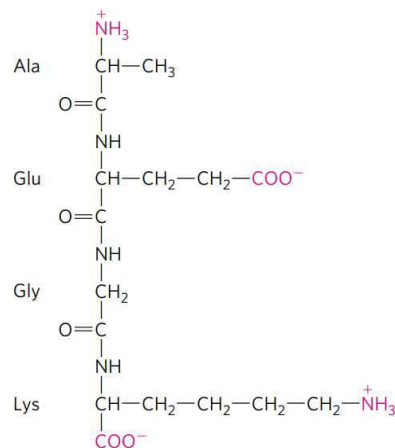
**FIGURA 3-15** Alanilglutamilglicilisina. Este tetrapeptídeo tem um grupo α -amino livre, um grupo α -carboxila livre e dois grupos R ionizáveis. Os grupos ionizados em pH 7,0 estão em cor-de-rosa.

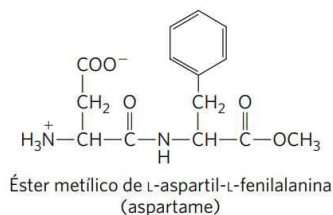
TABELA 3-2 Dados moleculares de algumas proteínas

Proteína	Peso molecular	Número de resíduos	Número de cadeias polipeptídicas
Citocromo <i>c</i> (humano)	12.400	104	1
Ribonuclease A (pâncreas bovino)	13.700	124	1
Lisozima (clara de ovo de galinha)	14.300	129	1
Mioglobina (coração de equinos)	16.700	153	1
Quimotripsina (pâncreas bovino)	25.200	241	3
Quimotripsinogênio (bovinos)	25.700	245	1
Hemoglobina (humana)	64.500	574	4
Albumina sérica (humana)	66.000	609	1
Hexocinase (levedura)	107.900	972	2
RNA-polimerase (<i>E. coli</i>)	450.000	4.158	5
Apolipoproteína B (humana)	513.000	4.536	1
Glutamina-sintase (<i>E. coli</i>)	619.000	5.628	12
Titina (humana)	2.993.000	26.926	1

res ambientais podem afetar o pK_a . Os valores de pK_a para os grupos R listados na Tabela 3-1 podem ser um guia útil para indicar a variação do pH no qual determinado grupo irá se ionizar, mas eles não podem ser estritamente aplicados quando o aminoácido passa a fazer parte de um peptídeo.

Peptídeos e polipeptídeos biologicamente ativos ocorrem em uma ampla variação de tamanhos e composições

Nenhuma generalização pode ser feita sobre as massas moleculares de peptídeos e proteínas biologicamente ativos tomando por base as suas respectivas funções. Peptídeos que ocorrem naturalmente variam em comprimento de dois a muitos milhares de resíduos de aminoácidos. Mesmo os menores peptídeos podem ter efeitos biologicamente importantes. Considere o dipeptídeo sintetizado comercialmente éster metílico de L-aspartil-L-fenilalanina, o adoçante artificial mais conhecido como aspartame ou NutraSweet.



Muitos peptídeos pequenos exercem seus efeitos em concentrações muito baixas. Por exemplo, vários hormônios de vertebrados (Capítulo 23) são peptídeos pequenos. Entre eles incluem-se a ocitocina (nove resíduos de aminoácidos), secretada pela glândula neuro-hipófise, que estimula as contrações uterinas, e o fator de liberação de tireotrofina (três resíduos), formado no hipotálamo e que estimula a liberação de outro hormônio, tireotrofina, da glândula adeno-hipófise. Alguns venenos extremamente tóxicos de cogu-

melos, como a amanitina, também são peptídeos pequenos, assim como muitos antibióticos.

O quanto as cadeias polipeptídicas em proteínas são compridas? Como a Tabela 3-2 mostra, os comprimentos variam consideravelmente. O citocromo *c* humano tem 104 resíduos de aminoácidos ligados em uma única cadeia; o quimotripsinogênio bovino tem 245 resíduos. A titina, constituinte dos músculos de vertebrados, tem aproximadamente 27 mil resíduos de aminoácidos e massa molecular de cerca de 3 milhões e está no extremo oposto. A grande maioria das proteínas que ocorrem naturalmente contém menos de 2 mil resíduos de aminoácidos e é muito menor do que a titina.

Algumas proteínas são constituídas por apenas uma única cadeia polipeptídica, porém outras, chamadas de proteínas de **multisubunidade**, têm dois ou mais polipeptídeos associados de modo não covalente (Tabela 3-2). As cadeias polipeptídicas individuais em uma proteína multisubunidade podem ser idênticas ou diferentes. Se pelo menos duas são idênticas, a proteína é chamada de **oligomérica**, e as unidades idênticas (consistindo em uma ou mais cadeias polipeptídicas) são chamadas de **protômeros**. A hemoglobina, por exemplo, tem quatro subunidades polipeptídicas: duas cadeias α idênticas e duas cadeias β idênticas, todas as quatro mantidas unidas por interações não covalentes. Cada subunidade α é pareada de modo idêntico com uma subunidade β dentro da estrutura dessa proteína multisubunidade, de modo que a hemoglobina pode ser considerada tanto um tetrâmero de quatro subunidades de polipeptídeos quanto um dímero de protômeros $\alpha\beta$.

Algumas proteínas contêm duas ou mais cadeias polipeptídicas ligadas covalentemente. Por exemplo, as duas cadeias polipeptídicas da insulina são unidas por ligações dissulfeto. Nestes casos, os polipeptídeos individuais não são considerados subunidades, mas são comumente chamados simplesmente de cadeias.

A composição de aminoácidos das proteínas também é muito variável. Os 20 aminoácidos comuns quase nunca

ocorrem em quantidades iguais em uma proteína. Alguns aminoácidos podem ocorrer apenas uma vez ou mesmo estar ausentes em determinado tipo de proteína; outros podem ocorrer em grande número. A Tabela 3-3 mostra a composição de aminoácidos do citocromo *c* e do quimotripsinogênio bovinos, este último o precursor inativo da enzima digestiva quimotripsina. Essas duas proteínas, com funções muito diferentes, também diferem significativamente quanto à relação entre o número de cada tipo de resíduo de aminoácido.

Pode-se calcular o número aproximado de resíduos de aminoácidos em uma proteína que não contenha quaisquer outros constituintes químicos dividindo a sua massa molecular por 110, uma vez que, embora a massa molecular média dos 20 aminoácidos comuns seja de cerca de 138, os aminoácidos menores predominam na maioria das proteí-

nas. Levando em conta as proporções nas quais os vários aminoácidos ocorrem em uma proteína média (Tabela 3-1; as médias foram determinadas pela pesquisa da composição dos aminoácidos de mais de 1.000 proteínas diferentes), a massa molecular média dos aminoácidos de uma proteína é mais próxima de 128. Como uma molécula de água (M_r 18) é removida para criar cada ligação peptídica, a massa molecular média de um resíduo de aminoácido em uma proteína é de cerca de $128 - 18 = 110$.

Algumas proteínas contêm outros grupos químicos além dos aminoácidos

Muitas proteínas, como, por exemplo, as enzimas ribonuclease A e a quimotripsina, contêm apenas resíduos de

TABELA 3-3 Composição de aminoácidos de duas proteínas

Aminoácido	Citocromo <i>c</i> bovino		Quimotripsinogênio bovino	
	Número de resíduos por molécula	Porcentagem do total ^a	Número de resíduos por molécula	Porcentagem do total ^a
Ala	6	6	22	9
Arg	2	2	4	1,6
Asn	5	5	14	5,7
Asp	3	3	9	3,7
Cys	2	2	10	4
Gln	3	3	10	4
Glu	9	9	5	2
Gly	14	13	23	9,4
His	3	3	2	0,8
Ile	6	6	10	4
Leu	6	6	19	7,8
Lys	18	17	14	5,7
Met	2	2	2	0,8
Phe	4	4	6	2,4
Pro	4	4	9	3,7
Ser	1	1	28	11,4
Thr	8	8	23	9,4
Trp	1	1	8	3,3
Tyr	4	4	4	1,6
Val	3	3	23	9,4
Total	104	102	245	99,7

Nota: algumas análises usuais, como a hidrólise ácida, não discriminam Asp de Asn, que são designados em conjunto como Asx (ou B). De forma semelhante, quando Glu e Gln não podem ser discriminados, eles são designados juntos como Glx (ou Z). Além do mais, Trp é destruído por hidrólise ácida. Métodos adicionais devem ser utilizados para se obter uma avaliação precisa do conteúdo completo de aminoácidos.

^aAs porcentagens não somam 100% em razão de arredondamentos.

TABELA 3-4 Proteínas conjugadas

Classe	Grupo prostético	Exemplo
Lipoproteínas	Lípídeos	β_1 -Lipoproteína do sangue
Glicoproteínas	Carboidratos	Imunoglobulina G
Fosfoproteínas	Grupos fosfato	Caseína do leite
Hemeproteínas	Heme (porfirina férrica)	Hemoglobina
Flavoproteínas	Nucleotídeos de flavina	Succinato-desidrogenase
Metaloproteínas	Ferro Zinco Cálcio Molibdênio Cobre	Ferritina álcool-desidrogenase Calmodulina Dinitrogenase Plastocianina

aminoácidos e nenhum outro constituinte químico; elas são consideradas proteínas simples. Entretanto, algumas proteínas contêm, além dos aminoácidos, componentes químicos permanentemente associados; elas são chamadas de **proteínas conjugadas**. A parte de uma proteína conjugada que não é aminoácido normalmente é chamada de **grupo prostético**. As proteínas conjugadas são classificadas com base na natureza química de seus grupos prostéticos (Tabela 3-4); por exemplo, **lipoproteínas** contêm lipídeos, **glicoproteínas** contêm grupos de açúcares e **metaloproteínas** contêm um metal específico. Algumas proteínas contêm mais de um grupo prostético. Normalmente, o grupo prostético desempenha um papel importante na função biológica da proteína.

RESUMO 3.2 Peptídeos e proteínas

- Aminoácidos podem ser unidos de modo covalente por meio de ligações peptídicas para formar peptídeos e proteínas. As células geralmente contêm milhares de proteínas diferentes, cada uma com uma atividade biológica diferente.
- Proteínas podem ser cadeias peptídicas muito longas de 100 a muitos milhares de resíduos de aminoácidos. Entretanto, alguns dos peptídeos que ocorrem naturalmente possuem apenas poucos resíduos de aminoácidos. Algumas proteínas são compostas por várias cadeias polipeptídicas associadas de modo não covalente, chamadas de subunidades.
- Proteínas simples produzem, por hidrólise, apenas aminoácidos. Proteínas conjugadas contêm, além dos aminoácidos, outros componentes, como um metal ou um grupo prostético.

3.3 Trabalhando com proteínas

O conhecimento sobre a estrutura e a função das proteínas pelos bioquímicos veio de estudos realizados com muitas proteínas, uma a uma. Para estudar detalhadamente uma proteína, o pesquisador deve ser capaz de separá-la de outras proteínas para obtê-la na forma pura e dominar as técnicas necessárias para determinar as propriedades. Os métodos para isso vêm da química de proteínas, disciplina tão

antiga quanto a própria bioquímica e que mantém uma posição central na pesquisa bioquímica.

Proteínas podem ser separadas e purificadas

Uma preparação pura é essencial para a determinação das propriedades e atividades de uma proteína. As células contêm milhares de diferentes tipos de proteínas; então como é que se pode purificar uma proteína? Métodos clássicos para separação de proteínas se aproveitam das diferenças de propriedade entre uma proteína e outra, incluindo o tamanho, a carga e as propriedades de ligação. Esses métodos foram complementados nas últimas décadas por outros métodos, envolvendo a clonagem do DNA e o sequenciamento do genoma, que podem simplificar o processo de purificação de proteínas. Os métodos mais recentes, apresentados nos Capítulos 8 e 9, frequentemente modificam artificialmente a proteína que está sendo purificada, adicionando poucos ou muitos resíduos de aminoácidos a uma ou a ambas as extremidades. Isso tem um preço: essas modificações podem levar à perda da atividade da proteína purificada. A purificação de proteínas nos seus estados nativos (a forma como funcionam nas células) geralmente utiliza os métodos descritos a seguir.

A fonte de determinada proteína é geralmente um tecido ou uma célula microbiana. A primeira etapa de qualquer procedimento de purificação de proteína é romper essas células, liberando as proteínas em uma solução chamada de **extrato bruto**. Se necessário, pode-se utilizar centrifugação diferencial para preparar frações subcelulares ou isolar organelas específicas (ver Figura 1-9).

Uma vez pronto o extrato ou a preparação de organelas, há vários métodos disponíveis para purificar uma ou mais das proteínas contidas no extrato. Em geral, o extrato é submetido a tratamentos para separar as proteínas em diferentes **frações** com base em uma propriedade, como tamanho ou carga, em um processo chamado de **fracionamento**. As etapas iniciais de fracionamento em um processo de purificação utilizam diferenças na solubilidade de proteínas, que são uma função complexa de pH, temperatura, concentração de sais e outros fatores. A solubilidade das proteínas é reduzida em presença de alguns sais, um efeito chamado de *salting out*. A adição desses sais na quantidade correta pode precipitar seletivamente algumas proteínas, enquanto

outras permanecem em solução. Particularmente eficaz, o sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) é muito utilizado para precipitar proteínas. As proteínas assim precipitadas são removidas daquelas que permanecem em solução por centrifugação em baixa rotação.

A solução contendo a proteína de interesse geralmente precisa ser modificada antes que seja possível passar para as etapas de purificação seguintes. Por exemplo, a **diálise** é um procedimento que separa proteínas de solutos pequenos ao se aproveitar do tamanho maior das proteínas. O extrato parcialmente purificado é colocado em uma bolsa ou tubo feito com uma membrana semipermeável. Quando este tubo é mergulhado em um volume muito maior de uma solução tamponada de força iônica adequada, a membrana permite a troca de sal e de solução tampão, mas não de proteínas. Desse modo, a diálise retém as proteínas grandes no interior da bolsa membranosa, ou tubo, permitindo que a concentração de outros solutos na preparação de proteínas se altere até ficarem em equilíbrio com a solução de fora da membrana. A diálise pode ser utilizada, por exemplo, para remover o sulfato de amônio da preparação proteica.

Os métodos mais eficientes para fracionar proteínas utilizam **cromatografia em coluna**, que se aproveita de diferenças na carga das proteínas, tamanho, afinidade de ligação e outras propriedades (**Figura 3-16**). Um material sólido poroso com propriedades químicas adequadas (fase estacionária) é mantido em uma coluna, e uma solução tamponada (fase móvel) migra através dela. A proteína, dissolvida na mesma solução tampão que foi utilizada para estabelecer a fase móvel, é colocada no topo da coluna. A proteína, então, atravessa a matriz sólida como uma banda que migra cada vez mais no interior da fase móvel maior. Proteínas individuais migram com mais rapidez ou lentidão através da coluna, dependendo de suas propriedades.

A **cromatografia de troca iônica** explora as diferenças no sinal e na magnitude da carga elétrica das proteínas em um determinado pH (**Figura 3-17a**). A matriz da coluna é um polímero sintético (resina) que contém grupos carregados ligados; aqueles ligados a grupos aniônicos são chamados de **trocadores de cátions**, e aqueles ligados a grupos catiônicos, de **trocadores de ânions**. A afinidade de cada proteína pelos grupos carregados na coluna é afetada pelo pH (que determina o estado de ionização da molécula) e a concentração de íons de sais livres competindo na solução circundante. A separação pode ser otimizada por mudanças graduais no pH e/ou na concentração de sal da fase móvel, de modo a criar um gradiente de pH ou de sal. Na **cromatografia de troca catiônica**, a matriz sólida tem grupos carregados negativamente. Na fase móvel, as proteínas com uma carga líquida positiva migram através da matriz mais lentamente que aquelas proteínas com uma carga final negativa, uma vez que a migração das primeiras é mais retardada por sua interação com a fase estacionária.

Em colunas de troca iônica, a expansão da banda de proteína na fase móvel (a solução proteica) é causada tanto pela separação de proteínas com diferentes propriedades quanto pela dispersão por difusão. À medida que o comprimento da coluna aumenta, a resolução entre dois tipos de

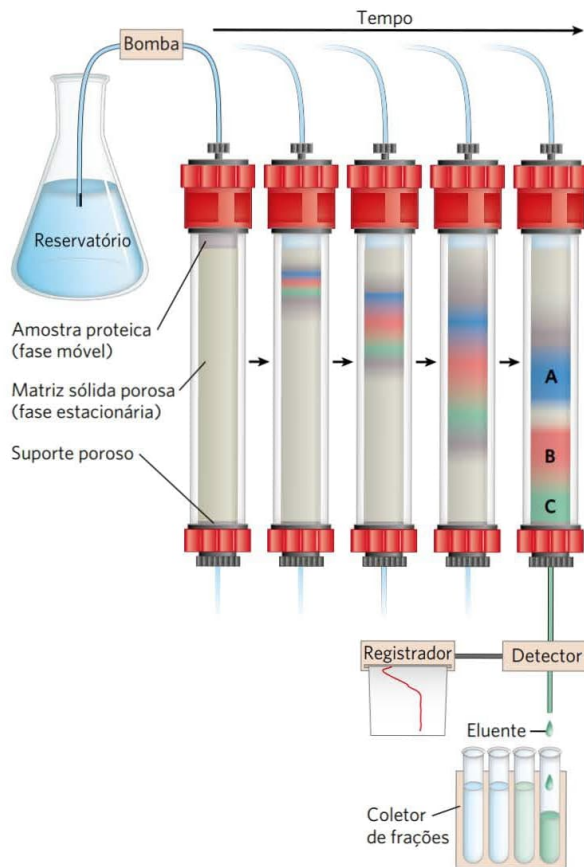


FIGURA 3-16 Cromatografia em coluna. Entre os elementos básicos de uma coluna cromatográfica está um material poroso (matriz) sólido apoiado no interior de uma coluna, geralmente feita de plástico ou vidro. Uma solução, a fase móvel, flui através da matriz, a fase estacionária. A solução que sai da coluna (o eluente) é constantemente substituída pela solução fornecida por um reservatório no topo. A solução de proteína a ser separada é colocada no topo da coluna e deixada percolar pela matriz sólida. Mais solução é adicionada no topo. A solução proteica forma uma banda no interior da fase móvel que tem inicialmente a profundidade da solução de proteína aplicada à coluna. À medida que as proteínas migram através da coluna (mostrada aqui em cinco momentos diferentes), elas são retardadas em diferentes graus devido às diferenças com que as proteínas interagem com o material da matriz. A banda total de proteína, portanto, amplia-se à medida que se move através da coluna. Tipos individuais de proteínas (como A, B e C, mostradas em azul, vermelho e verde) se separam gradualmente umas das outras, formando bandas no interior da banda proteica mais larga. A separação melhora (i.e., aumenta a resolução) à medida que o comprimento da coluna aumenta. Entretanto, cada banda proteica individual também se alarga com o tempo devido à dispersão por difusão, processo que diminui a resolução. Nesse exemplo, a proteína A está bem separada de B e C, porém, nas condições usadas, a dispersão por difusão impede a separação completa de B e C.

proteínas com diferentes cargas finais geralmente melhora. Entretanto, a velocidade na qual a solução proteica pode fluir através da coluna geralmente diminui com o comprimento da coluna. E, à medida que o tempo dispendido na coluna aumenta, a resolução pode diminuir como resultado da dispersão por difusão no interior de cada banda proteica. À medida que o conteúdo da solução proteica sai de uma

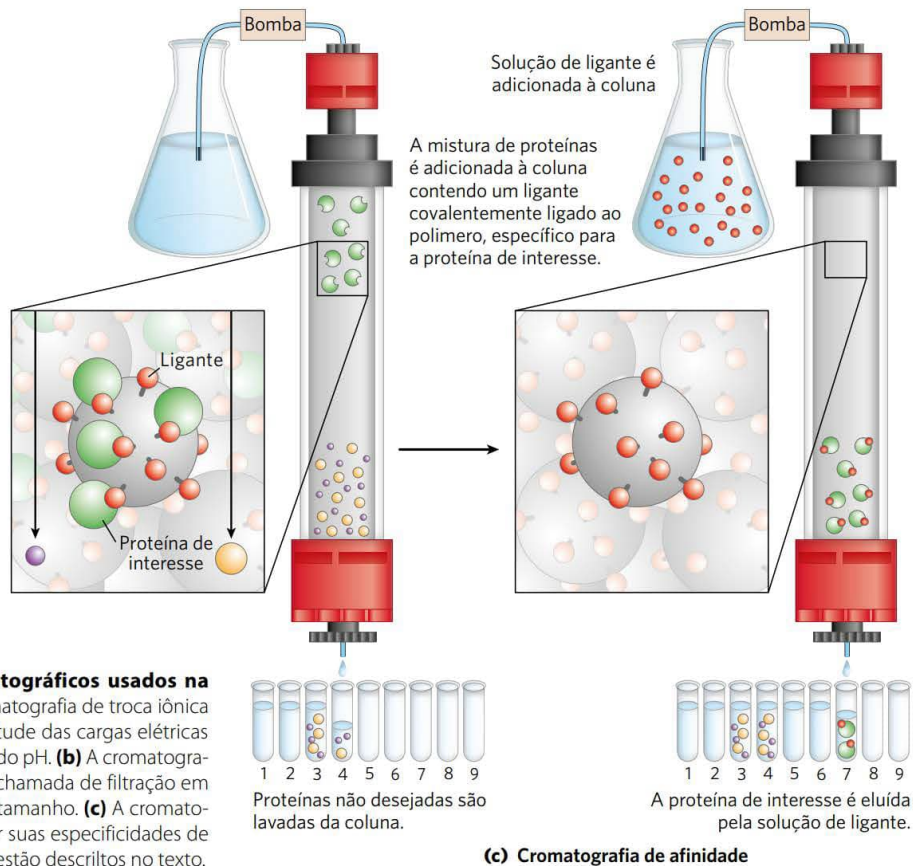
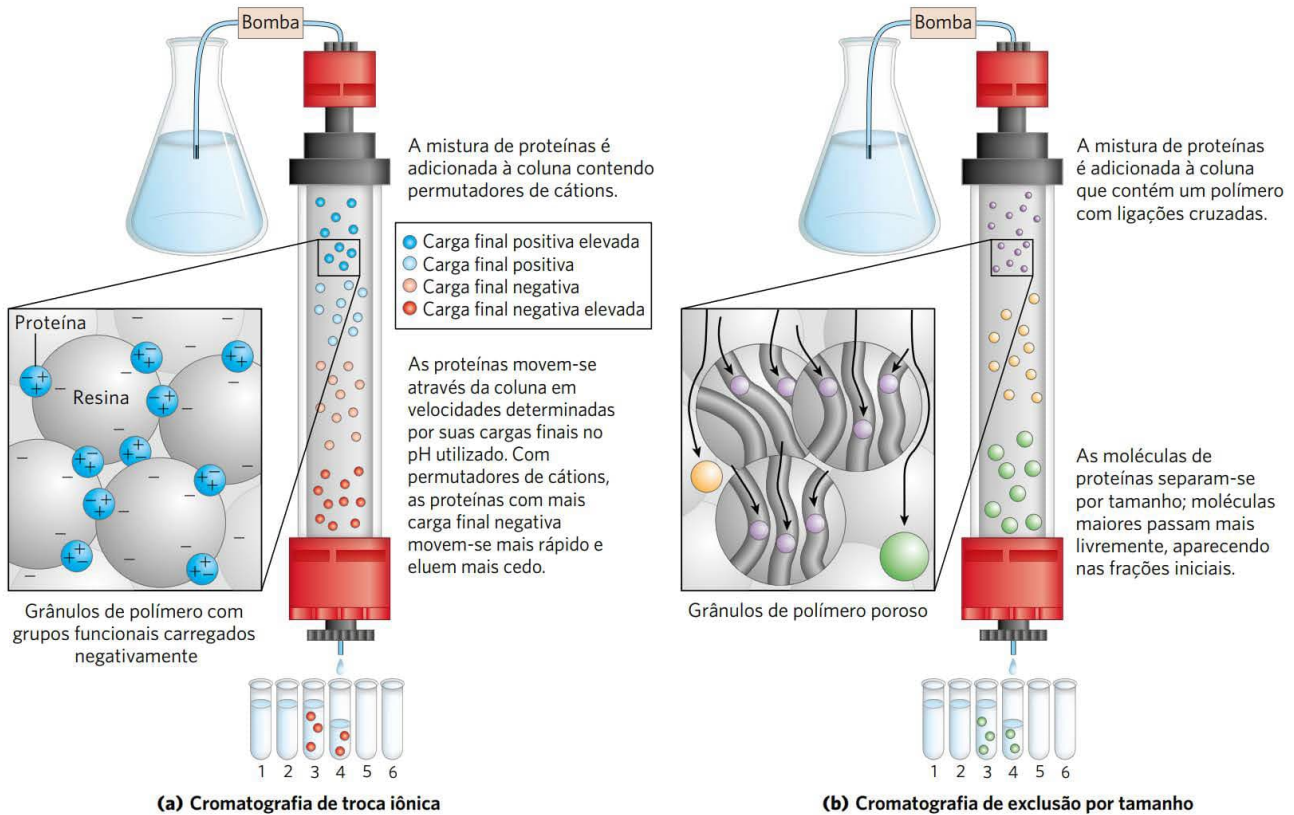


FIGURA 3-17 Três métodos cromatográficos usados na purificação de proteínas. **(a)** A cromatografia de troca iônica explora diferenças no sinal e na magnitude das cargas elétricas líquidas de proteínas em um determinado pH. **(b)** A cromatografia de exclusão por tamanho, também chamada de filtração em gel, separa proteínas de acordo com o tamanho. **(c)** A cromatografia de afinidade separa proteínas por suas especificidades de ligação. mais detalhes desses métodos estão descritos no texto.

coluna, porções sucessivas (frações) desse eluente são coletadas em tubos de ensaio. Cada fração pode ser testada para a presença da proteína de interesse, assim como outras propriedades, como a força iônica ou a concentração total de proteínas. Todas as frações positivas para a proteína de interesse podem ser reunidas como o produto dessa etapa cromatográfica da purificação de proteínas.

PROBLEMA 3-1 Troca iônica de peptídeos

Um bioquímico deseja separar dois peptídeos por cromatografia por troca iônica. No pH da fase móvel a ser utilizada na coluna, um peptídeo (A) possui uma carga líquida de -3 , em decorrência da presença de mais resíduos de Glu e Asp do que de Arg, Lys e His. O peptídeo B tem carga final de 1 . Qual peptídeo eluirá primeiro de uma resina de troca catiônica? Qual eluirá primeiro a partir da resina de troca aniônica?

Solução: uma resina de troca catiônica possui cargas negativas e se liga a moléculas carregadas positivamente, retardando seu progresso pela coluna. O peptídeo B, com sua carga líquida positiva, interagirá mais fortemente do que o peptídeo A com a resina de troca catiônica e, portanto, o peptídeo A eluirá primeiro. Em uma resina de troca aniônica, o peptídeo B eluirá primeiro. O peptídeo A, sendo carregado negativamente, será retardado por sua interação com a resina positivamente carregada.

A Figura 3-17 mostra duas outras variações da cromatografia em coluna além da troca iônica. A **cromatografia de exclusão por tamanho**, também chamada de filtração em gel (Figura 3-17b), separa as proteínas de acordo com o tamanho. Neste método, as proteínas grandes emergem da coluna mais cedo do que as proteínas menores – resultado um tanto contrário ao esperado intuitivamente. A fase sólida consiste em grânulos de polímeros reticulados com poros ou cavidades projetados com um determinado tamanho. As proteínas grandes não podem entrar nas cavidades e, assim, percorrem um caminho mais curto (e mais rápido) através da coluna, rodeando os grânulos. Proteínas pequenas penetram nas cavidades e são retardadas em seu caminho de labirintos através da coluna. A cromatografia de exclusão por tamanho também pode ser utilizada para estimar o tamanho de uma proteína que está sendo purificada, utilizando métodos semelhantes aos descritos na Figura 3-19.

A **cromatografia de afinidade** baseia-se na afinidade de ligação (Figura 3-17c). Os grânulos na coluna têm um grupo químico covalentemente ligado chamado de ligante – um grupo ou molécula que se liga a uma macromolécula, como uma proteína. Quando uma mistura de proteínas é adicionada à coluna, qualquer proteína com afinidade para esse ligante se liga aos grânulos e sua migração através da matriz é retardada. Por exemplo, se a função biológica de uma proteína envolve ligação a ATP, então, prendendo-se uma molécula que se assemelha ao ATP a esses grânulos da coluna, cria-se uma matriz de afinidade que pode ajudar a purificar a proteína. À medida que a solução proteica se

desloca através da coluna, as proteínas que ligam ATP (incluindo a proteína de interesse) se ligam à matriz. Após a lavagem das proteínas que não se ligam à coluna, a proteína ligada é eluída por uma solução contendo uma alta concentração de sal ou um ligante livre – nesse caso, o próprio ATP ou um análogo do ATP. O sal enfraquece a ligação da proteína ao ligante imobilizado, interferindo com as interações iônicas. O ligante livre compete com o ligante preso aos grânulos, liberando a proteína da matriz. Em geral, a proteína de interesse elui da coluna ligada ao ligante utilizado para eluí-la.

Normalmente, a purificação por métodos cromatográficos é melhorada com a utilização de **HPLC**, ou **cromatografia líquida de alto desempenho**. A HPLC faz uso de bombas de alta pressão que aceleram o movimento das moléculas de proteína através da coluna e também usa materiais cromatográficos de maior qualidade que podem suportar a força de esmagamento produzida pelo fluxo de líquido pressurizado. Reduzindo o tempo de trânsito na coluna, a HPLC pode limitar a dispersão por difusão das bandas proteicas e, assim, melhorar grandemente a resolução.

A abordagem para purificar uma proteína que não tenha sido previamente isolada é guiada pelo exame de como outras proteínas foram purificadas e o bom senso. Na maioria dos casos, deve-se utilizar vários métodos em sequência para conseguir purificar uma proteína totalmente, com cada método separando as proteínas com base em uma propriedade diferente. Por exemplo, se uma etapa separa as proteínas ligadoras de ATP daquelas que não se ligam a ATP, então, a próxima etapa deve separar as várias proteínas ligadoras de ATP com base no tamanho ou na carga para isolar a proteína específica que se quer. A escolha dos métodos é um tanto empírica, e muitas estratégias devem ser tentadas até encontrar a mais eficaz. Em geral, pode-se minimizar o processo de tentativa e erro baseando o novo procedimento em técnicas de purificação desenvolvidas para proteínas semelhantes. Protocolos de purificação de milhares de proteínas foram publicados e estão disponíveis. O bom senso faz procedimentos mais baratos, como, por exemplo, o *salting out*, serem utilizados primeiro, quando o volume total e o número de contaminantes são maiores. Os métodos cromatográficos geralmente são impraticáveis nas fases iniciais, visto que a quantidade de meio cromatográfico necessário aumenta com o tamanho da amostra. À medida que cada etapa de purificação se completa, o tamanho da amostra geralmente fica menor (Tabela 3-5), possibilitando o uso de procedimentos cromatográficos mais sofisticados (e caros) nas fases posteriores.

Proteínas podem ser separadas e caracterizadas por eletroforese

Outra técnica importante para separação de proteínas tem como base a migração de proteínas carregadas em um campo elétrico, um processo chamado de **eletroforese**. Em geral, esses procedimentos não são utilizados para purificar proteínas, pois existem alternativas mais simples e os métodos eletroforéticos geralmente têm efeitos adversos sobre a estrutura e, conseqüentemente, sobre a função das proteínas. Entretanto, como método analítico, a eletroforese é extremamente importante. Sua vantagem é que as pro-

TABELA 3-5 Tabela de purificação para uma enzima hipotética

Procedimento ou etapa	Volume da fração (mL)	Proteína total (mg)	Atividade (unidades)	Atividade específica (unidades/mg)
1. Extrato celular bruto	1.400	10.000	100.000	10
2. Precipitação com sulfato de amônio	280	3.000	96.000	32
3. Cromatografia de troca iônica	90	400	80.000	200
4. Cromatografia de exclusão por tamanho	80	100	60.000	600
5. Cromatografia de afinidade	6	3	45.000	15.000

Nota: todos os dados representam o estado da amostra *após* a realização do procedimento indicado. Atividade e atividade específica estão definidas na página 95. Depois de 5 etapas, a enzima em questão foi purificada por um fator de 1.500 vezes, o que se reflete no aumento da atividade específica: entre o extrato cru e a preparação final. O rendimento foi de 45%, que é o reflexo da recuperação da atividade total.

teínas podem ser visualizadas, bem como separadas, permitindo ao pesquisador estimar rapidamente o número de proteínas diferentes em uma mistura ou o grau de pureza de uma preparação proteica específica. A eletroforese também pode ser utilizada para determinar propriedades cruciais de uma proteína, como seu ponto isoelétrico, e estimar a massa molecular.

Em geral, a eletroforese de proteínas é realizada em géis compostos de polímeros reticulados de poli(acrilami-

da (**Figura 3-18**). O gel de poli(acrilamida) age como uma peneira molecular, retardando a migração de proteínas aproximadamente em função da relação massa-carga. A migração também pode ser afetada pela forma da proteína. Na eletroforese, a força que move as macromoléculas é o potencial elétrico, E . A mobilidade eletroforética, μ , de uma molécula é a razão entre a velocidade de migração V e o potencial elétrico. A mobilidade eletroforética é também igual à carga líquida Z da molécula dividida por seu

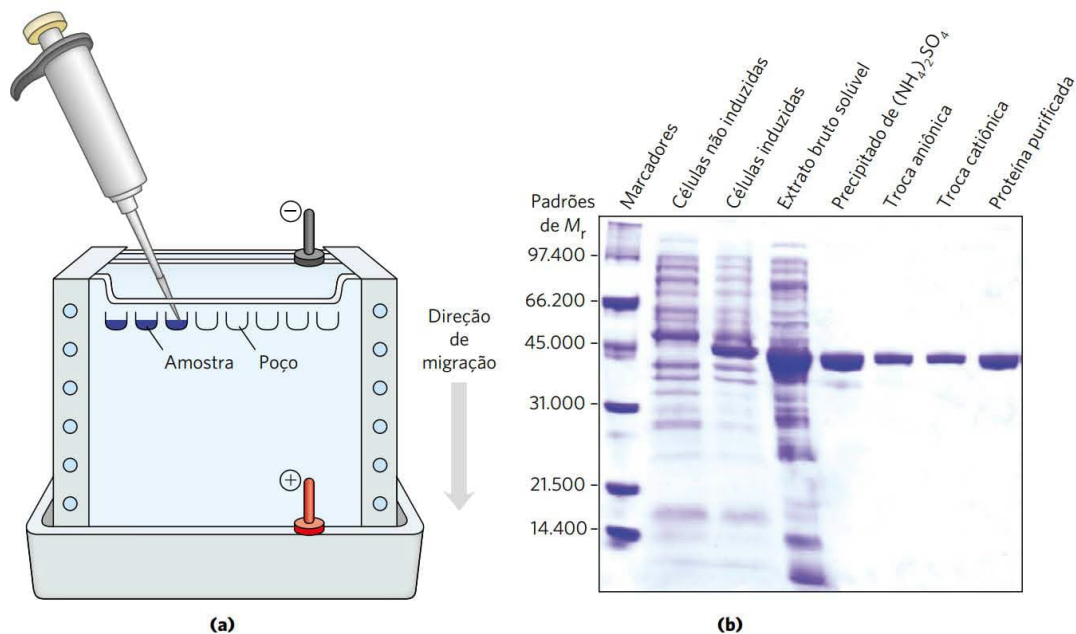


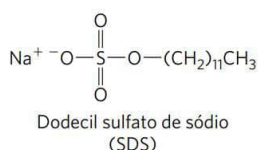
FIGURA 3-18 Eletroforese. (a) As amostras são colocadas em poços ou depressões no topo do gel de SDS-poli(acrilamida). As proteínas movem-se através do gel quando é aplicado um campo elétrico. O gel minimiza as correntes de convecção causadas pelos pequenos gradientes de temperatura, bem como movimentos proteicos além daqueles induzidos pelo campo elétrico. As proteínas podem ser visualizadas, após eletroforese, tratando o gel com um corante, como o azul Coomassie, que se liga às proteínas, mas não ao gel em si. Cada banda no gel representa uma proteína diferente (ou subunidade de proteína). (b) Proteínas menores movem-se através do gel mais rapidamente do que as maiores e, portanto, acabam ficando mais próximas da base do gel. Esse gel ilustra a purificação da proteína RecA de *Escherichia coli* (descrita no Capítulo 25). O gene para a proteína RecA foi clonado (Capítulo 9) para que sua expressão (síntese proteica) pudesse ser controlada. A primeira canaleta mostra um conjunto de proteínas padrão (proteínas com M_r conhecido), servindo como marcadores de massa molecular. As duas canaletas seguintes mostram proteínas de células de *Escherichia coli* antes e depois de a síntese da proteína RecA ser induzida. A quarta canaleta mostra as proteínas presentes no extrato celular bruto. As canaletas seguintes (da esquerda para a direita) mostram as proteínas presentes após as sucessivas etapas de purificação. A proteína purificada é uma cadeia polipeptídica única ($M_r \sim 38.000$), como mostrado na canaleta mais à direita. [Fonte: (b) Dr. Julia Cox.]

coeficiente de fricção f , que reflete, em parte, a forma de uma proteína. Portanto:

$$\mu = \frac{V}{E} = \frac{Z}{f}$$

A migração de uma proteína em um gel durante a eletroforese é, portanto, uma função do tamanho e da forma da proteína.

Um método eletroforético comumente empregado para estimar a pureza e a massa molecular utiliza o detergente **dodecil sulfato de sódio (SDS)** (“dodecil” significa uma cadeia de 12 carbonos).



A quantidade de SDS que uma proteína liga é cerca de 1,4 vezes a sua massa, aproximadamente uma molécula de SDS para cada resíduo de aminoácido. O SDS ligado contribui com uma grande carga final negativa, de modo que a carga intrínseca da proteína passa a ser insignificante e confere a cada proteína uma relação carga-massa semelhante. Além disso, a ligação com SDS desdobra parcialmente as proteínas, de modo que a maior parte das proteínas ligadas ao SDS passa a ter uma forma semelhante a bastonetes. A eletroforese na presença de SDS, portanto, separa proteínas quase que exclusivamente com base na massa (massa molecular), com os peptídeos menores migrando mais rapidamente. Após a eletroforese, as proteínas são visualizadas

pela adição de um corante, como o azul de Coomassie, que se liga às proteínas, mas não ao gel em si (Figura 3-18b). Assim, um pesquisador pode monitorar o progresso de um procedimento de purificação de proteínas verificando que o número de bandas de proteínas visíveis no gel diminui após cada nova fase de fracionamento. Quando comparada com as posições às quais as proteínas de massa molecular conhecida migram no gel, a posição de uma proteína não identificada pode proporcionar uma boa estimativa de sua massa molecular (Figura 3-19). Caso a proteína tenha duas ou mais subunidades diferentes, estas são geralmente separadas pelo tratamento com SDS e uma banda separada aparece para cada uma das subunidades.

A **focalização isoeétrica** é um procedimento utilizado para determinar o ponto isoeletrico (pI) de uma proteína (Figura 3-20). Um gradiente de pH é formado permitindo que uma mistura de ácidos e bases orgânicas de baixo peso molecular (anfólitos; p. 81) se distribua em um campo elétrico gerado ao longo do gel. Quando uma mistura de proteínas é aplicada, cada proteína migra até alcançar o pH correspondente ao seu pI. Proteínas com pontos isoeletricos diferentes são, assim, distribuídas de modo diferente ao longo do gel.

A combinação da focalização isoeletrica com a eletroforese em SDS em sequência é um processo chamado de **eletroforese bidimensional**, o qual permite a resolução de misturas complexas de proteínas (Figura 3-21). Esse é um método analítico mais sensível do que qualquer método eletroforético isoladamente. A eletroforese bidimensional separa proteínas de massa molecular idêntica que diferem no pI e proteínas com valores de pI semelhantes, mas com massas moleculares diferentes.

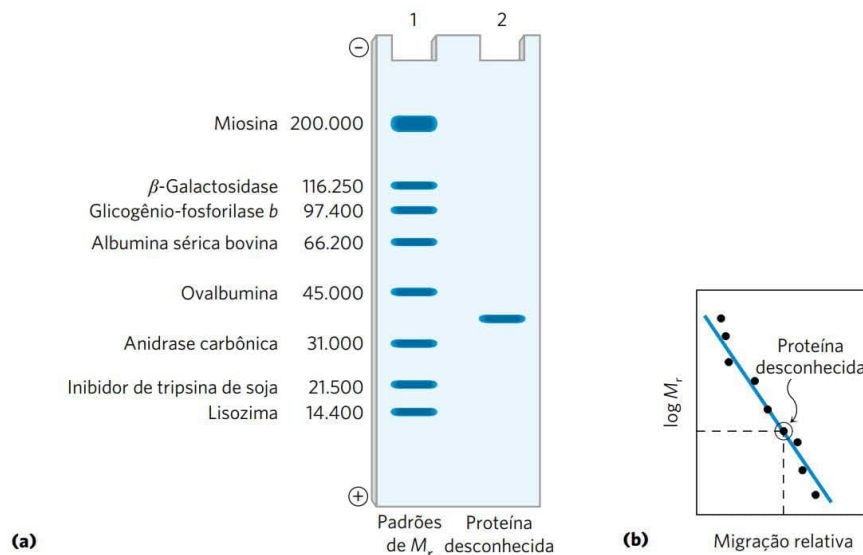


FIGURA 3-19 Estimando a massa molecular de uma proteína. A mobilidade eletroforética de uma proteína em gel de SDS-poliacrilamida está relacionada à sua massa molecular, M_r . **(a)** Proteínas-padrão de massa molecular conhecida são submetidas à eletroforese (calha 1). Estas proteínas marcadoras podem ser usadas para estimar a massa molecular de uma proteína desconhecida (canaleta 2). **(b)** Um gráfico do $\log M_r$ das proteínas marcadoras versus a migração relativa durante a eletroforese é linear, permitindo que a massa molecular da proteína desconhecida seja inferida a partir do gráfico. (De maneira semelhante, um conjunto de proteínas-padrão com tempos de retenção reproduzíveis em uma coluna de exclusão por tamanho pode ser usado para criar uma curva padrão de tempo de retenção versus $\log M_r$. O tempo de retenção de uma substância desconhecida na coluna pode ser comparado com sua curva padrão para obter um M_r aproximado.)

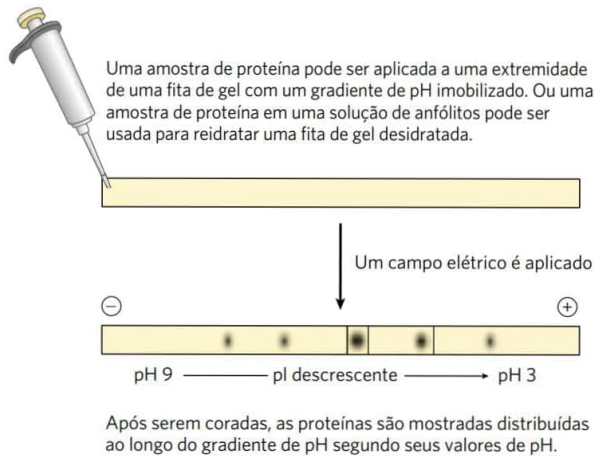


FIGURA 3-20 Focalização isoeletrica. Essa técnica separa proteínas de acordo com os seus pontos isoeletricos. Uma mistura de proteínas é colocada em uma fita de gel contendo um gradiente de pH imobilizado. Com a aplicação de um campo elétrico, as proteínas entram no gel e migram até que cada uma atinja o pH equivalente ao seu pI. Lembre-se que quando $\text{pH} = \text{pI}$, a carga final de uma proteína é zero.

Proteínas não separadas podem ser quantificadas

Para purificar uma proteína, é essencial possuir um meio para detectar e quantificar a proteína de interesse na presença de muitas outras proteínas em cada estágio do procedimento. Muitas vezes, a purificação deve prosseguir na ausência de qualquer informação sobre o tamanho ou propriedades físicas da proteína ou sobre o quanto da massa proteica total do extrato corresponde a proteína de interesse. Para proteínas que são enzimas, a quantidade presente em uma determinada solução ou extrato de tecido pode ser medida ou ensaiada, em termos do efeito catalítico que a enzima produz – isto é, o *aumento* na velocidade em que seu substrato é convertido em produtos da reação quando a enzima está presente. Para isso, o pesquisador deve conhecer (1) a equação geral da reação catalisada, (2) um procedimento analítico para determinar o desaparecimento de um dos substratos ou o aparecimento de um dos produtos da reação, (3) se a enzima necessita de cofatores, como íons metálicos ou coenzimas, (4) a dependência da atividade enzimática da concentração do substrato, (5) o pH ótimo e (6) uma faixa de temperatura em que a enzima seja estável e possua alta atividade. A atividade das enzimas é geralmente ensaiada no seu pH ótimo e a uma temperatura conveniente na faixa de 25 a 38°C. Uma concentração muito alta do substrato também é geralmente usada, de modo que a velocidade inicial da reação, medida experimentalmente, seja proporcional à concentração de enzima (Capítulo 6).

Por convenção internacional, a unidade 1,0 de atividade enzimática para a maior parte das enzimas é definida como a quantidade de enzima que leva à transformação de 1,0 μmol de substrato em produto, por minuto, a 25°C, sob condições ótimas de medição (para algumas enzimas, essa definição não é conveniente, e uma unidade diferente pode ser definida). O termo **atividade** refere-se às unidades totais de uma enzima que está presente em uma solução. A **atividade es-**

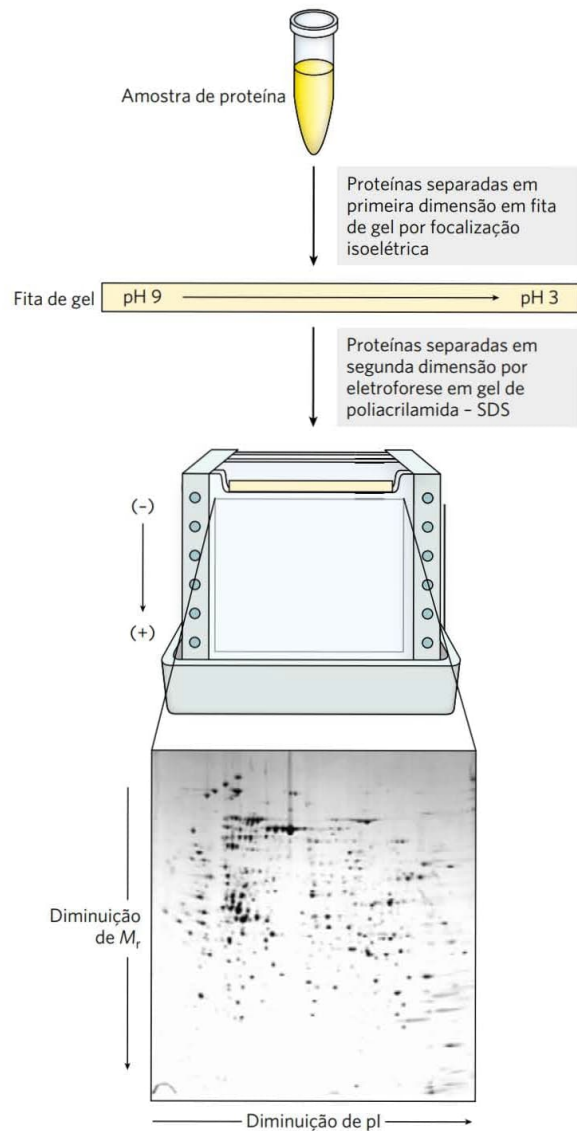


FIGURA 3-21 Eletroforese bidimensional. As proteínas são primeiro separadas por focalização isoeletrica em uma fita de gel fina. O gel é colocado, então, horizontalmente em um segundo gel em forma de placa, e as proteínas são separadas por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida. A separação horizontal reflete diferenças nos valores de pI; a separação vertical reflete diferenças nas massas moleculares. As proteínas da amostra original são, desse modo, espalhadas em duas dimensões. Milhares de proteínas celulares podem ser resolvidas usando essa técnica. Manchas de proteínas individuais podem ser cortadas do gel e identificadas por espectrometria de massas (ver Figuras 3-30 e 3-31). [Fonte: cortesia de Axel Mogk, a partir de A. Mogk et al., *EMBO J.* 18:6934, 1999, Fig. 7A.]

pecífica é o número de unidades de enzimas por miligrama de proteína total (**Figura 3-22**). A atividade específica é uma medida de pureza da enzima: ela aumenta durante o processo de purificação de uma enzima e se torna máxima e constante quando a enzima está pura (Tabela 3-5, p. 93).

Após cada etapa de purificação, a atividade da preparação (em unidades de atividade enzimática) é analisada, a quantidade total de proteína é determinada independente-

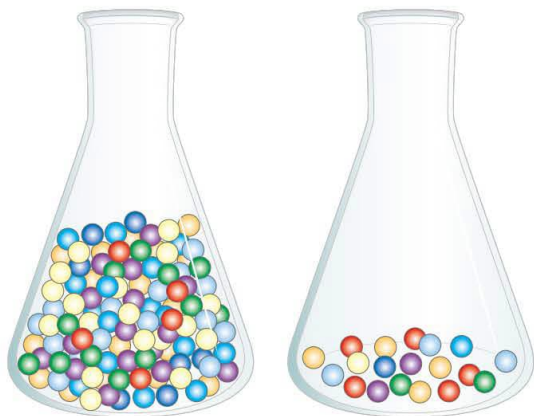


FIGURA 3-22 Atividade versus atividade específica. A diferença entre esses termos pode ser ilustrada considerando dois frascos contendo esferas. Os dois frascos contêm o mesmo número de esferas vermelhas, mas números diferentes de esferas de outras cores. Se as esferas representam proteínas, ambos os frascos contêm a mesma atividade da proteína representada pelas esferas vermelhas. O segundo frasco, no entanto, apresenta atividade específica maior, uma vez que as esferas vermelhas representam uma proporção maior do total de esferas.

mente e a relação entre as duas fornece a atividade específica. A atividade e a proteína total geralmente diminuem a cada etapa. A atividade diminui porque há sempre alguma perda em consequência da inativação ou de interações não ideais com materiais cromatográficos ou outras moléculas presentes na solução. A proteína total diminui porque o objetivo é remover o máximo possível as proteínas inespecíficas e indesejadas. Em uma etapa bem-sucedida, a perda de proteína inespecífica é muito maior que a perda de atividade; portanto, a atividade específica aumenta mesmo que a atividade total diminua. Os dados são organizados em uma tabela de purificação semelhante à Tabela 3-5. Em geral, uma proteína é considerada pura quando novas etapas de purificação já não conseguem aumentar a atividade específica e quando apenas uma única espécie de proteína pode ser detectada (p. ex., por eletroforese).

Para proteínas que não são enzimas é necessário usar outros métodos de quantificação. Proteínas de transporte podem ser analisadas pela sua ligação à molécula que elas

transportam e hormônios e toxinas pelo efeito biológico que produzem; por exemplo, hormônios de crescimento estimularão o crescimento de certas células em cultura. Algumas proteínas estruturais representam uma grande fração de uma massa do tecido a ponto de ela ser rapidamente extraída e purificada sem realizar ensaio funcional. Os modos de purificar proteínas são tão variados quanto as próprias proteínas.

RESUMO 3.3 Trabalhando com proteínas

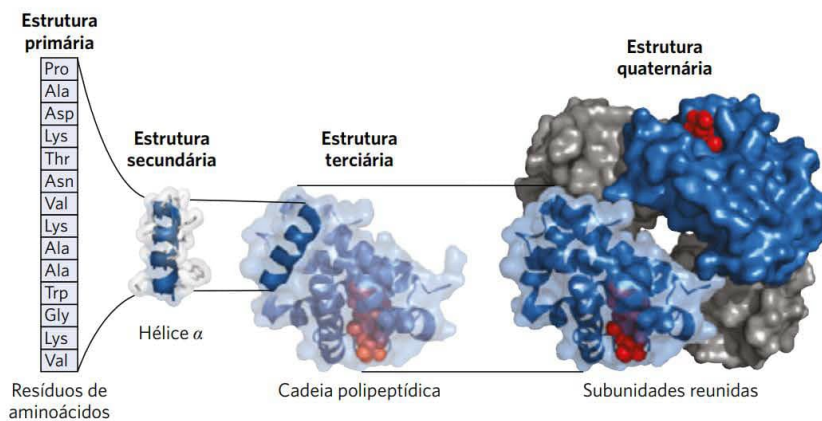
- As proteínas são separadas e purificadas com base em diferenças nas suas propriedades. Elas podem ser seletivamente precipitadas por mudanças no pH ou na temperatura e, sobretudo, pela adição de certos sais. Uma ampla gama de procedimentos cromatográficos faz uso de diferenças no tamanho, afinidades de ligação, carga e outras propriedades. Isso inclui troca iônica, exclusão por tamanho, afinidade e cromatografia líquida de alto desempenho.
- A eletroforese separa proteínas com base na massa ou na carga. A eletroforese em gel SDS e a focalização isoeletrica podem ser utilizadas separadamente ou em combinação para ter uma resolução maior.
- Todos os procedimentos de purificação exigem um método de quantificação ou de análise da proteína de interesse na presença de outras proteínas. A purificação pode ser monitorada por análise da atividade específica.

3.4 Estrutura das proteínas: estrutura primária

A purificação de uma proteína é geralmente apenas uma etapa preliminar para uma dissecação bioquímica detalhada da estrutura e da função. O que torna uma proteína uma enzima, outra um hormônio, outra uma proteína estrutural e ainda outra um anticorpo? Como elas se diferem quimicamente? As diferenças mais óbvias são estruturais, e a seguir a estrutura das proteínas será discutida.

A estrutura de moléculas grandes, como proteínas, pode ser descrita em vários níveis de complexidade organizados com base em algum conceito de hierarquia conceitual. Quatro níveis de estrutura proteica são comumente definidos (**Figura 3-23**). A descrição de todas as ligações covalentes

FIGURA 3-23 Níveis de estrutura nas proteínas. A estrutura primária consiste em uma sequência de aminoácidos unidos por ligações peptídicas e inclui as ligações dissulfeto. O polipeptídeo resultante pode ser disposto em unidades de estrutura secundária, como uma α -hélice. A hélice é uma parte da estrutura terciária do polipeptídeo dobrado, que, por si mesmo, é uma das subunidades que compõem a estrutura quaternária da proteína com subunidades, nesse caso a hemoglobina. [Fonte: PDB ID 1HGA, R. Liddington et al., *J. Mol. Biol.* 228:551, 1992.]



(principalmente ligações peptídicas e ligações dissulfeto) ligando resíduos de aminoácidos em uma cadeia polipeptídica é a **estrutura primária**. O elemento mais importante da estrutura primária é a *sequência* de resíduos de aminoácidos. A **estrutura secundária** refere-se a arranjos particularmente estáveis de resíduos de aminoácidos dando origem a padrões estruturais recorrentes. A **estrutura terciária** descreve todos os aspectos do enovelamento tridimensional de um polipeptídeo. Quando uma proteína tem duas ou mais subunidades polipeptídicas, seus arranjos no espaço são chamados de **estrutura quaternária**. Nossa investigação sobre as proteínas, por fim, inclui máquinas proteicas complexas constituídas por dezenas de milhares de subunidades. A estrutura primária é o foco do restante deste capítulo, e os níveis mais elevados de estrutura estão discutidos no Capítulo 4.

As diferenças na estrutura primária podem dar muita informação. Cada proteína tem tanto um número como uma sequência de resíduos de aminoácidos distintos. Como será visto no Capítulo 4, a estrutura primária de uma proteína determina como ela se enovela em sua estrutura tridimensional própria e única, e isso, por sua vez, determina a função da proteína. Primeiro, serão considerados os indícios empíricos de que a sequência de aminoácidos e a função da proteína estão intimamente ligadas; em seguida, será descrito como se determina a sequência de aminoácidos e, finalmente, serão destacados os vários usos dessas informações.

A função de uma proteína depende da sua sequência de aminoácidos

A bactéria *Escherichia coli* produz mais de 3 mil proteínas diferentes; um ser humano tem 20 mil genes que codificam um número muito maior de proteínas (por meio de processos genéticos discutidos na Parte III deste livro). Em ambos os casos, cada tipo de proteína possui uma sequência de aminoácidos única que resulta em uma estrutura tridimensional específica. Essa estrutura, por sua vez, confere uma função específica.

Algumas observações simples ilustram a importância da estrutura primária, ou a sequência de aminoácidos de uma proteína. Em primeiro lugar, como já foi observado, proteínas com funções diferentes sempre possuem sequências de aminoácidos diferentes. Em segundo lugar, milhares de doenças genéticas humanas foram rastreadas quanto à produção de proteínas defeituosas. O defeito pode variar de uma simples troca na sequência de aminoácidos (como na anemia falciforme, descrita no Capítulo 5) até a deleção de uma porção maior da cadeia polipeptídica (como na maior parte dos casos da distrofia muscular de Duchenne: uma grande deleção no gene que codifica a proteína distrofina leva à produção de uma proteína encurtada e inativa). Por fim, comparando-se proteínas de diferentes espécies e que têm funções semelhantes, descobriu-se que essas proteínas geralmente têm sequências de aminoácidos semelhantes. Portanto, uma ligação íntima entre a estrutura primária da proteína e sua função é evidente.

A sequência de aminoácidos de determinada proteína é totalmente fixa, isto é, invariável? Não; é possível alguma

flexibilidade. Estima-se que 20 a 30% das proteínas humanas sejam **polimórficas**, tendo variações nas sequências de aminoácidos na população humana. Muitas dessas variações nas sequências têm pouco ou nenhum efeito na função da proteína. Além disso, proteínas que desempenham funções semelhantes em espécies filogeneticamente distantes podem ser muito diferentes no tamanho geral e na sequência de aminoácidos.

Embora a sequência de aminoácidos em algumas regiões da estrutura primária possa variar consideravelmente sem afetar a função biológica, a maior parte das proteínas contém regiões cruciais que são essenciais para suas funções e, portanto, as sequências devem ser conservadas. A parte da sequência que é crucial varia de proteína para proteína, complicando a tarefa de relacionar a sequência com a estrutura tridimensional e relacionar a estrutura com a função. Antes de considerar esse problema com mais detalhes, é preciso examinar como se obtém informações sobre as sequências.

As sequências de aminoácidos de milhões de proteínas já foram determinadas

Duas grandes descobertas feitas em 1953 tiveram importância fundamental na história da bioquímica. Nesse ano, James D. Watson e Francis Crick deduziram a estrutura em dupla-hélice do DNA e propuseram que a precisão da replicação tem como base a estrutura do DNA (Capítulo 8). Essa proposta esclareceu a realidade molecular que está por trás da ideia de gene. No mesmo ano, Frederick Sanger descobriu a sequência de resíduos de aminoácidos nas cadeias polipeptídicas do hormônio insulina (**Figura 3-24**), surpreendendo muitos pesquisadores que pensavam há muito tempo que a determinação da sequência de aminoácidos de um polipeptídeo seria uma tarefa difícil fadada ao fracasso. Logo ficou evidente que a sequência de nucleotídeos no DNA e a sequência de aminoácidos nas proteínas estavam de algum modo relacionadas. Quase uma década após essas descobertas, o código genético foi elucidado, relacionando a sequência de nucleotídeos do DNA com a sequência de aminoácidos nas moléculas de proteínas (Capítulo 27). As sequências de aminoácidos de proteínas agora geralmente são inferidas indiretamente a partir das sequências de DNA em bancos de dados genômicos. Entretanto, uma série de técnicas derivadas de métodos tradicionais de sequenciamento de polipeptídeos ainda tem um lugar importante na química de proteínas. O método tradicional e algumas das técnicas derivadas dele serão resumidos a seguir.

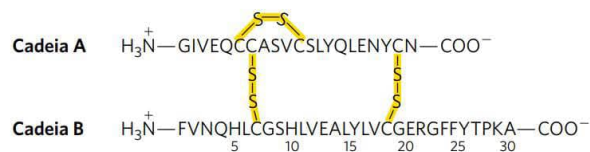
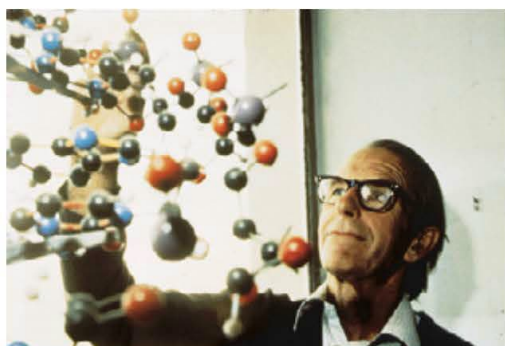


FIGURA 3-24 Sequência de aminoácidos da insulina bovina. As duas cadeias de polipeptídeos estão unidas por ligações cruzadas de dissulfeto (em amarelo). A cadeia A da insulina é idêntica no homem, porco, cão, coelho e cachalote. As cadeias B de vaca, porco, cão, bode e cavalo são idênticas.

A química de proteínas é mais rica devido a métodos derivados do sequenciamento clássico de polipeptídeos

Os métodos utilizados na década de 1950 por Fred Sanger para determinar a sequência da proteína insulina estão resumidos, em sua forma moderna, na **Figura 3-25**. Hoje, poucas proteínas são sequenciadas desse modo, ao menos para determinar a sequência completa. Foi comentado acima que a sequência de uma proteína pode ser predita a partir do conhecimento da sequência do gene que codifica essa proteína. Essa informação agora está disponível em bancos de dados genômicos que crescem a cada dia. Entretanto, esses protocolos de sequenciamento tradicionais têm proporcionado uma rica variedade de ferramentas para os bioquímicos. Quase todas as etapas mostradas na Figura 3-25 fazem uso de métodos que são amplamente utilizados, algumas vezes em contextos bastante diferentes.



Frederick Sanger, 1918-2013 [Fonte: UPI/Corbis-Bettmann.]

No esquema tradicional de sequenciamento de proteínas grandes, o resíduo aminoterminal do aminoácido é inicialmente marcado, e a sua identidade é determinada. O grupo α -aminoterminal pode ser marcado com 1-flúor-2,4-dinitrobenzeno (FDNB), cloreto de dansila ou cloreto de dabsilo (**Figura 3-26**).

O processo de sequenciamento químico em si é baseado em um processo de duas etapas desenvolvido por Pehr Edman (**Figura 3-27**). O processo da **degradação de Edman** marca e remove apenas o resíduo aminoterminal de um peptídeo, deixando todas as outras ligações peptídicas intactas. O peptídeo reage com fenilisotiocianato em condições levemente alcalinas e, como resultado, o aminoácido aminoterminal é convertido em um aduto de feniltiocarbamoila (PTC). A ligação peptídica próxima ao aduto de PTC é, então, clivada em uma etapa realizada em ácido trifluoroacético anídrico e isso remove o aminoácido aminoterminal na forma de derivado anilintiazolinona. O derivado do aminoácido aminoterminal é extraído com solventes

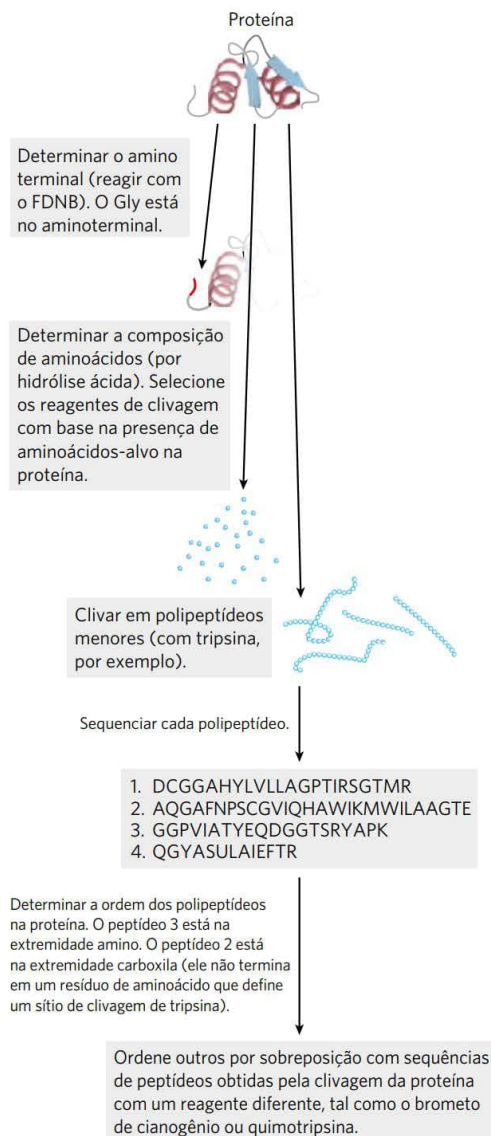


FIGURA 3-25 Sequenciamento direto de proteínas. Os procedimentos aqui apresentados são aqueles que foram desenvolvidos por Fred Sanger para sequenciar a insulina e desde então têm sido usados para sequenciar muitas outras proteínas. FDNB é 1-flúor-2,4-dinitrobenzeno (ver texto e Figura 3-26).

orgânicos, convertido em um derivado da feniltiocarbamoila mais estável por meio de tratamento com ácido em solução aquosa e, finalmente, identificado. A utilização de um processo com reações sequenciais levadas a cabo em condi-

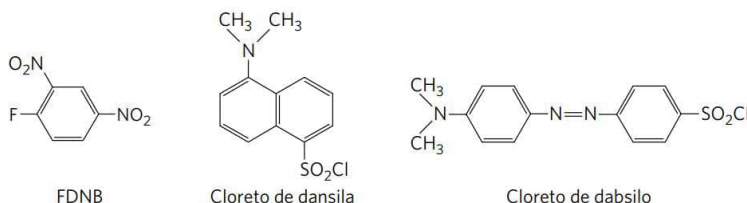


FIGURA 3-26 Reagentes usados para modificar o grupo α -amino do aminoácido terminal.

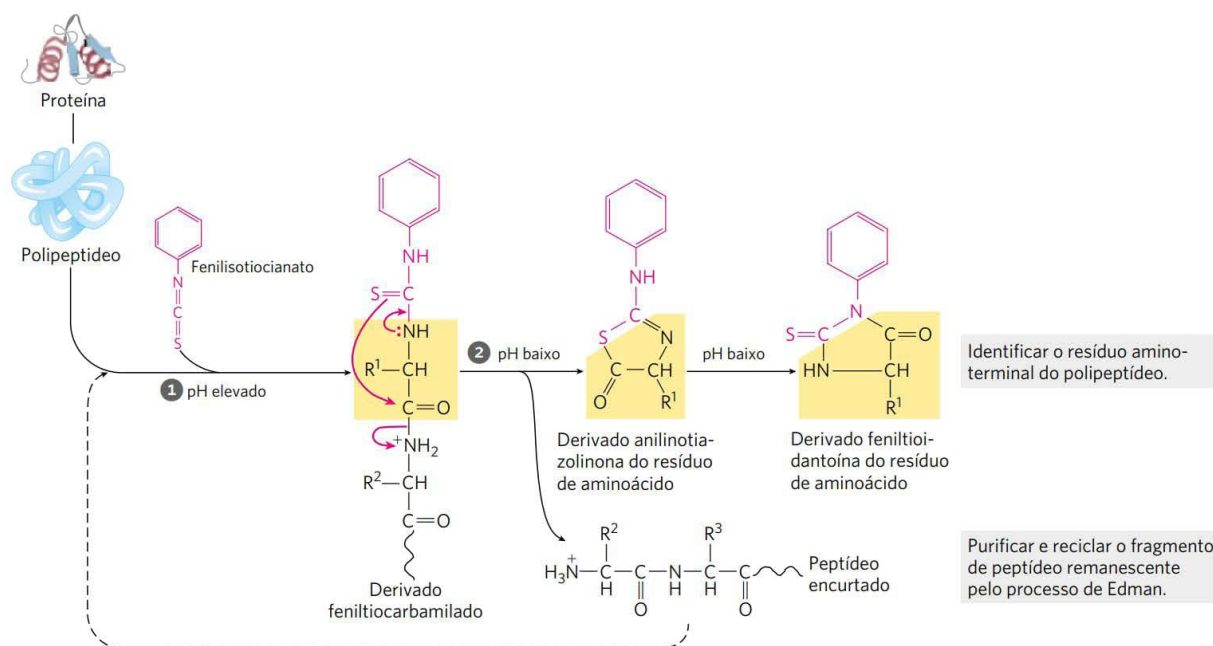


FIGURA 3-27 A química de sequenciamento de proteínas desenvolvida por Pehr Edman. A ligação peptídica do aminoterminal da proteína ou do polipeptídeo é clivada em duas etapas. As duas etapas são levadas a cabo sob condições de reação muito diferentes (condições básicas na etapa 1 e ácidas na etapa 2), deixando que uma etapa prossiga até seu final antes que a segunda comece.

ções primeiro básicas e depois em ácidas proporciona uma maneira de controlar todo o processo. Cada reação com o aminoácido aminoterminal pode chegar, essencialmente, ao fim sem afetar qualquer outra ligação peptídica no peptídeo. O processo se repete até que, em geral, uma sequência de 40 resíduos de aminoácidos é identificada. As reações da degradação de Edman foram automatizadas.

Para determinar a sequência de proteínas grandes, os pioneiros no desenvolvimento de protocolos de sequenciamento tiveram de desenvolver métodos para eliminar as ligações dissulfeto e para clivar com toda a precisão as proteínas para formar polipeptídeos menores. Duas abordagens para a degradação irreversível das ligações dissulfeto estão destacadas na **Figura 3-28**. As enzimas chamadas de

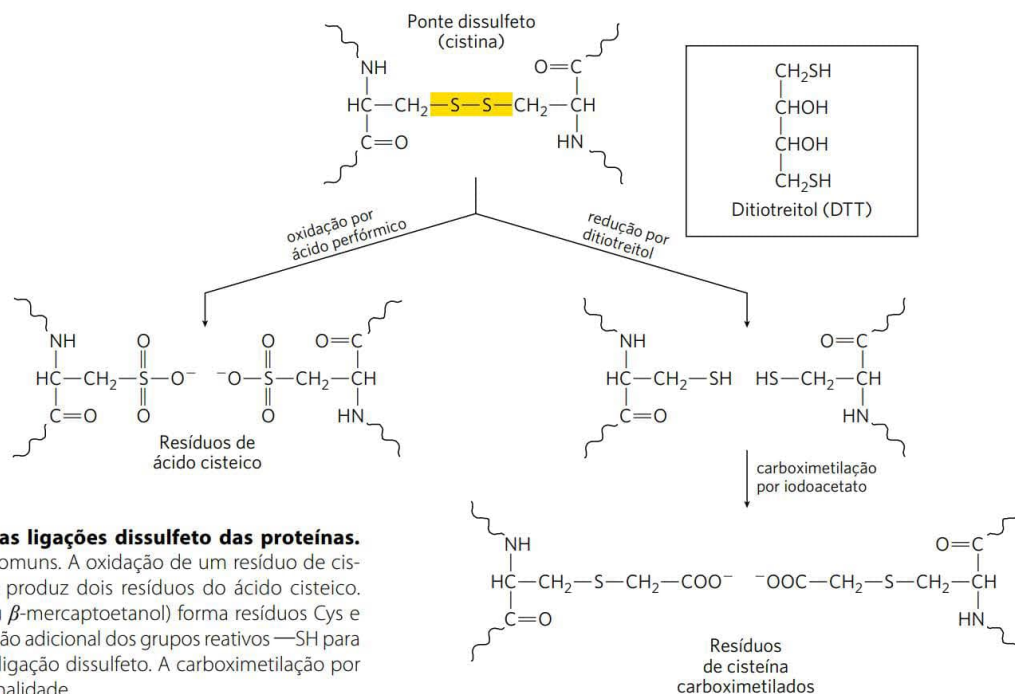


FIGURA 3-28 Quebrando as ligações dissulfeto das proteínas. Ilustração de dois métodos comuns. A oxidação de um resíduo de cisteína com ácido perbórico produz dois resíduos do ácido cisteico. A redução por ditiotreitol (ou β -mercaptoetanol) forma resíduos Cys e deve ser seguida de modificação adicional dos grupos reativos $-SH$ para impedir a nova formação da ligação dissulfeto. A carboximetilação por iodoacetato serve para essa finalidade.

TABELA 3-6 Especificidade de alguns métodos comuns para fragmentação de cadeias polipeptídicas

Reagente (fonte biológica) ^a	Pontos de clivagem ^b
Tripsina (pâncreas bovino)	Lys, Arg (C)
Protease submaxilar (glândula submaxilar de camundongos)	Arg (C)
Quimotripsina (pâncreas bovino)	Phe, Trp, Tyr (C)
Protease V8 de <i>Staphylococcus aureus</i> (bactéria <i>S. aureus</i>)	Asp, Glu (C)
Asp-N-protease (bactéria <i>Pseudomonas fragi</i>)	Asp, Glu (N)
Pepsina (estômago porcino)	Leu, Phe, Trp, Tyr (N)
Endopeptidase Lys C (bactéria <i>Lysobacter enzymogenes</i>)	Lys (C)
Brometo de cianogênio	Met (C)

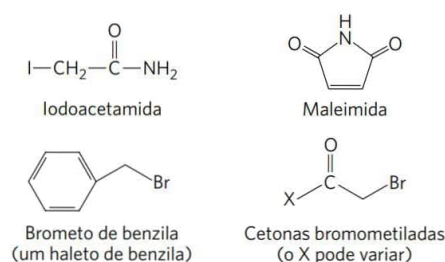
^aTodos os reagentes, com exceção do brometo de cianogênio, são proteases. Todos estão disponíveis a partir de fontes comerciais.

^bResíduos fornecendo o ponto principal de reconhecimento para a protease ou reagentes; a quebra da ligação peptídica ocorre ou no lado carbonílico (C) ou no lado amino (N) dos resíduos de aminoácidos indicados.

proteases catalisam a clivagem hidrolítica de ligações peptídicas. Algumas proteases clivam apenas a ligação peptídica adjacente a determinados resíduos de aminoácidos (Tabela 3-6) e, portanto, fragmentam uma cadeia polipeptídica de uma maneira previsível e reproduzível. Alguns reagentes químicos também clivam a ligação peptídica adjacente em resíduos específicos. Entre as proteases, a enzima digestiva tripsina catalisa a hidrólise apenas daquelas ligações peptídicas em que o grupo carbonila é fornecido por um resíduo de Lys ou por um resíduo de Arg, independentemente do comprimento ou da sequência de aminoácidos da cadeia. Um polipeptídeo com três resíduos Lys e/ou Arg irá normalmente gerar quatro peptídeos menores na clivagem com a tripsina. Além disso, todos os peptídeos gerados, exceto um, terão Lys ou Arg como terminal carboxila. A escolha de um reagente para clivar a proteína em peptídeos menores pode ser auxiliada, primeiro, determinando o conteúdo de aminoácidos de toda a proteína, empregando ácido para reduzir a proteína aos seus aminoácidos constituintes. A tripsina é utilizada apenas em proteínas com um número adequado de resíduos de Lys ou Arg.

No sequenciamento clássico, uma proteína grande é clivada duas vezes para produzir fragmentos utilizando uma protease ou um reagente de clivagem diferente a cada vez, fazendo as extremidades finais dos fragmentos serem diferentes. Ambos os conjuntos de fragmentos são purificados e sequenciados. A ordem em que os fragmentos apareceram na proteína original pode, então, ser determinada pela análise das sobreposições de sequência dos dois conjuntos de fragmentos.

Mesmo não sendo mais utilizados para sequenciar proteínas inteiras, os métodos de sequenciamento tradicionais ainda são valiosos no laboratório. O sequenciamento de alguns aminoácidos a partir do terminal amino utilizando a química de Edman geralmente é suficiente para confirmar a identidade de uma proteína conhecida que acabou de ser purificada ou para identificar uma proteína desconhecida purificada com base em alguma atividade incomum. As técnicas empregadas nas etapas individuais do método de sequenciamento tradicional também são úteis para outras finalidades. Por exemplo, os métodos utilizados para quebrar as ligações dissulfeto podem tam-

**FIGURA 3-29** Reagentes usados para modificar os grupos sulfidríla dos resíduos Cys. (Ver também Figura 3-28.)

bém ser utilizados para desnaturar proteínas quando isso é necessário.

Além disso, os esforços para marcar o resíduo de aminoácido aminoterminal levaram eventualmente ao desenvolvimento de uma série de reagentes que podem reagir com grupos específicos em uma proteína. Os mesmos reagentes utilizados para marcar o grupo α -amino aminoterminal podem ser empregados para marcar as aminas primárias dos resíduos Lys (Figura 3-26). O grupo sulfidríla nos resíduos Cys pode ser modificado com iodoacetamidas, maleimidas, haletos de benzila e bromometil-cetonas (**Figura 3-29**). Outros resíduos de aminoácidos podem ser modificados por reagentes ligados a corantes ou a outra molécula para auxiliar na detecção da proteína ou em estudos funcionais.

A espectrometria de massas é um método alternativo para determinar sequências de aminoácidos

Adaptações modernas da **espectrometria de massas** propiciaram uma alternativa importante aos métodos de sequenciamento descritos anteriormente. A espectrometria de massas pode obter a massa molecular de uma proteína com extrema precisão, mas também pode muito mais. Em especial, algumas variantes das técnicas de espectrometria de massas podem fornecer rapidamente sequências de muitos segmentos pequenos de polipeptídeos (20 a 30 resíduos de aminoácidos) de uma amostra de proteína.

O espectrômetro de massas tem sido há muito tempo uma ferramenta indispensável na química. As moléculas a

serem analisadas, chamadas de **analitos**, são inicialmente ionizadas no vácuo. Quando as moléculas agora carregadas são introduzidas em um campo elétrico e/ou magnético, os percursos que seguem através do campo são uma função da razão da massa em relação à carga, m/z . A determinação dessa característica das espécies ionizadas permite deduzir a massa (m) do analito com muita precisão.

Embora a espectrometria de massas venha sendo utilizada há muitos anos, ela não podia ser aplicada a macromoléculas, como proteínas e ácidos nucleicos. As medições de m/z são realizadas em moléculas na fase gasosa, e o aquecimento e outros tratamentos necessários para transferir uma macromolécula para a fase gasosa geralmente provocam sua rápida decomposição. Em 1988, duas técnicas diferentes foram desenvolvidas para superar esse problema. Em uma, as proteínas são colocadas em uma matriz absorvedora de luz. Com um pulso curto de luz *laser*, as proteínas são ionizadas e, em seguida, desorvidas da matriz em um sistema de vácuo. Esse processo, conhecido como **espectrometria de massas de dessorção/ionização a laser assistida por matriz**, ou **MALDI MS**, tem sido utilizado com sucesso para medir a massa de uma ampla variedade de macromoléculas. Em um segundo e bem-sucedido método, as macromoléculas em solução são forçadas diretamente da fase líquida para a gasosa. Uma solução de analitos é passada através de uma agulha carregada que é mantida em um alto potencial elétrico, dispersando a solução em uma névoa fina de microgotas carregadas. Os solventes que circundam as macromoléculas evaporam rapidamente, deixando íons de macromoléculas multicarregadas na fase gasosa. Essa técnica é chamada de **espectrometria de massas com ionização por eletroaspersão**, ou **ESI MS**. Os prótons adicionados durante a passagem através da agulha fornecem carga adicional à macromolécula. O m/z da molécula pode ser analisado na câmara de vácuo.

A espectrometria de massas fornece uma riqueza de informações para a pesquisa proteômica, a enzimologia e a química de proteínas em geral. Essas técnicas precisam apenas de quantidades minúsculas de amostra, de modo que podem ser rapidamente aplicadas às diminutas quantidades de proteína que podem ser extraídas de uma eletroforese em gel bidimensional. A medição precisa da massa molecular de uma proteína é fundamental para identificar a proteína. Uma vez que a massa de uma proteína seja perfeitamente conhecida, a espectrometria de massas é um método conveniente e preciso para detectar alterações na massa devido à presença de cofatores ligados, íons metálicos ligados, modificações covalentes, e assim por diante.

O processo para a determinação da massa molecular de uma proteína com ESI MS está ilustrado na **Figura 3-30**. À medida que é injetada na fase gasosa, a proteína adquire do solvente um número variável de prótons e, portanto, cargas positivas. A adição variável dessas cargas cria um espectro de espécies com diferentes razões massa/carga. Cada pico sucessivo corresponde a uma espécie que difere do seu pico vizinho por uma diferença de carga de 1 e uma diferença de massa de 1 (um próton). A massa da proteína pode ser determinada a partir de dois picos consecutivos.

A espectrometria de massas também pode ser utilizada para sequenciar trechos curtos de polipeptídeos, uma aplicação que surgiu como ferramenta inestimável para a iden-

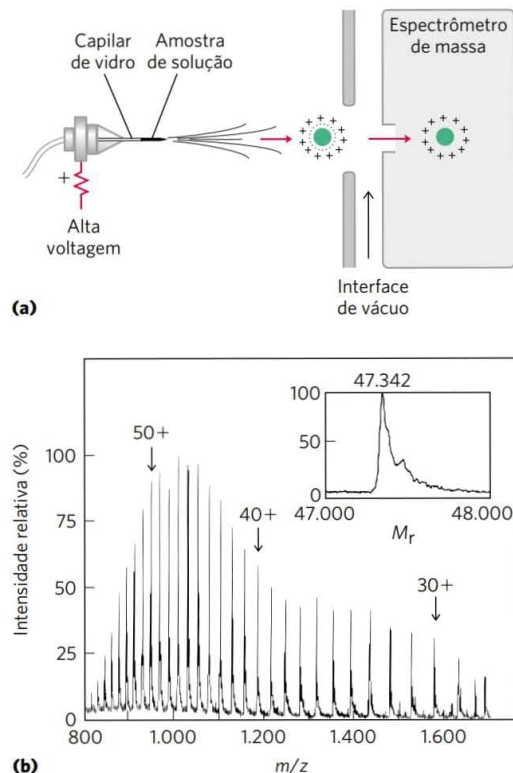


FIGURA 3-30 Espectrometria de massas com ionização por eletroaspersão de uma proteína. **(a)** Uma solução de proteína é dispersa em gotículas altamente carregadas pela passagem através de uma agulha sob a influência de um campo elétrico de alta voltagem. As gotículas evaporam, e os íons (com prótons adicionados, nesse caso) entram no espectrômetro de massa para medição de m/z . **(b)** O espectro gerado é uma família de picos, com cada pico sucessivo (da direita para a esquerda) correspondendo a uma espécie carregada com massa e carga aumentadas em 1. A inserção mostra uma transformação desse espectro gerada por computador. [Fonte: informações de M. Mann e M. Wilm, *Trends Biochem. Sci.* 20:219, 1995.]

tificação rápida de proteínas desconhecidas. A informação da sequência é extraída utilizando-se uma técnica chamada de **tandem MS**, ou **MS/MS**. Uma solução contendo a proteína investigada é inicialmente tratada com uma protease ou reagente químico para hidrolisá-la a uma mistura de peptídeos menores. A mistura, em seguida, é injetada em um equipamento que é essencialmente formado por dois espectrômetros de massas em tandem (**Figura 3-31a**, parte superior). No primeiro, a mistura de peptídeos é disposta no equipamento de modo que apenas um dos vários tipos de peptídeos produzidos pela clivagem surge na outra extremidade. A amostra do peptídeo selecionado, no qual molécula possui uma carga em algum ponto ao longo de seu comprimento, desloca-se, então, através de uma câmara de vácuo entre os dois espectrômetros de massas. Nesse compartimento de colisão, o peptídeo é fragmentado adicionalmente por impacto de alta energia com um “gás de colisão”, como o hélio ou o argônio, que é colocado na câmara de vácuo. Cada peptídeo individual é quebrado em apenas um local, em média. Embora as quebras não sejam hidrolíticas, a maior parte ocorre nas ligações peptídicas.

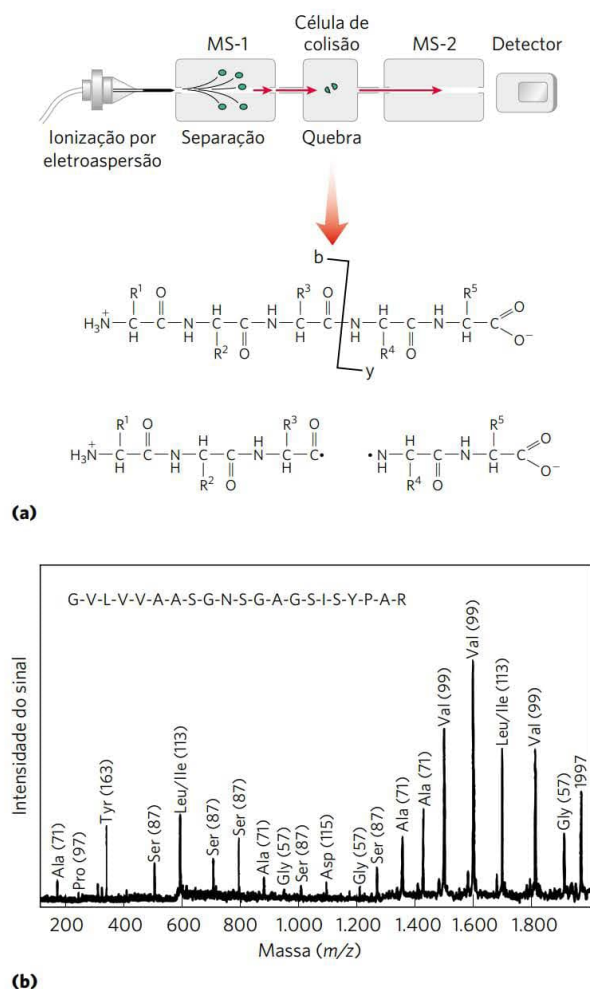


FIGURA 3-31 Obtendo informação da sequência proteica com MS em tandem. (a) Após a hidrólise proteolítica, uma solução proteica é injetada em um espectrômetro de massas (MS-1). Os diferentes peptídeos são dispostos de modo que apenas um tipo de peptídeo é selecionado para análise adicional. O peptídeo selecionado é fragmentado em uma câmara entre os dois espectrômetros de massas, e a m/z para cada fragmento é medida no segundo espectrômetro de massas (MS-2). Muitos dos íons gerados nessa segunda fragmentação resultam da quebra da ligação peptídica, como mostrado. Eles são chamados de íons tipo b ou íons tipo y, dependendo de se a carga é retida no lado aminoterminal ou carboxiterminal, respectivamente. (b) Espectro típico com picos representando os fragmentos de peptídeos gerados a partir de uma amostra de um peptídeo pequeno (21 resíduos). Os picos marcados são íons tipo y derivados de resíduos de aminoácidos. O número entre parênteses acima de cada pico é a massa molecular do íon do aminoácido. Os picos sucessivos diferem pela massa de um determinado aminoácido no peptídeo original. A sequência deduzida é mostrada no topo. [Fonte: informação de T. Keough et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:7131, 1999, Fig. 3.]

O segundo espectrômetro de massas mede, em seguida, as razões m/z de todos os fragmentos carregados. Esse processo gera um ou mais conjuntos de picos. Um determinado conjunto de picos (Figura 3-31b) consiste em todos os fragmentos carregados que foram gerados pela quebra do mesmo tipo de ligação (mas em diferentes pontos no peptídeo). Um conjunto de picos inclui apenas os fragmentos nos quais a carga foi retida no lado aminoterminal das ligações quebra-

das; outro inclui apenas os fragmentos nos quais a carga foi retida no lado carboxiterminal das ligações quebradas. Cada pico sucessivo em um determinado conjunto tem um aminoácido a menos que o pico anterior. A diferença na massa entre dois picos identifica o aminoácido que foi perdido em cada caso, revelando, portanto, a sequência do peptídeo. As únicas ambiguidades envolvem a leucina e a isoleucina, pois elas têm a mesma massa. Embora múltiplos conjuntos de picos sejam normalmente gerados, os dois conjuntos mais proeminentes geralmente consistem em fragmentos carregados derivados da quebra das ligações peptídicas. A sequência de aminoácidos derivada de um conjunto de picos pode ser confirmada pelo outro conjunto de picos, melhorando o grau de confiança na informação da sequência obtida.

Os vários métodos para obter informação sobre sequências proteicas se complementam. O procedimento da degradação de Edman é algumas vezes conveniente para obter a informação da sequência unicamente a partir do terminal amino de uma proteína ou peptídeo. Entretanto, ele é relativamente lento e requer uma amostra maior do que a espectrometria de massas. A espectrometria de massas pode ser utilizada para pequenas quantidades de amostras e para amostras misturadas. Ela fornece a informação da sequência, mas os processos de fragmentação podem deixar lacunas imprevisíveis na sequência. Embora a maior parte das sequências de proteínas seja atualmente extraída de sequências do DNA genômico (Capítulo 8) empregando-se o conhecimento do código genético (Capítulo 27), muitas vezes é necessário fazer o sequenciamento direto da proteína para identificar amostras de proteínas desconhecidas. Ambos os métodos de sequenciamento de proteínas permitem identificar proteínas recém-purificadas sem nenhuma ambiguidade. A espectrometria de massas é o método de escolha para identificar proteínas que estão presentes em pequenas quantidades. Por exemplo, a técnica é sensível o suficiente para analisar algumas centenas de nanogramas de proteínas que podem ser extraídos de uma única banda de proteína em um gel de poliácridamida. O sequenciamento direto por espectrometria de massas também pode revelar a adição de grupos fosforila ou outras modificações na proteína (Capítulo 6). O sequenciamento por qualquer um dos métodos pode revelar mudanças na sequência de proteínas que resultam da edição do RNA mensageiro em eucariotos (Capítulo 26). Portanto, todos esses métodos fazem parte de um conjunto de ferramentas robustas utilizadas para investigar as proteínas e suas funções.

Pequenos peptídeos e proteínas podem ser sintetizados quimicamente

Muitos peptídeos são potencialmente úteis como agentes farmacológicos e sua produção tem uma importância comercial considerável. Há três modos de se obter um peptídeo: (1) purificação a partir de tecidos, tarefa geralmente dificultada devido às concentrações extremamente baixas de alguns peptídeos; (2) engenharia genética (Capítulo 9); ou (3) síntese química direta. Atualmente, técnicas muito poderosas tornam a síntese química direta uma opção atrativa em muitos casos. Além das aplicações comerciais, a síntese de segmentos peptídicos específicos de proteínas maiores tem aumentado de importância como ferramenta para o estudo da estrutura e função das proteínas.

A complexidade das proteínas torna as abordagens sintéticas tradicionais da química orgânica inviáveis para peptídeos com mais de quatro ou cinco resíduos de aminoácidos. Um dos problemas é a dificuldade de purificar os produtos ao final de cada etapa do processo.

O maior avanço nessa tecnologia foi dado por R. Bruce Merrifield, em 1962. A novidade foi sintetizar o peptídeo mantendo-o ligado por uma das extremidades a um suporte sólido. O suporte é um polímero insolúvel (resina) conti-

do no interior de uma coluna, semelhante ao utilizado em procedimentos cromatográficos. O peptídeo é construído sobre esse suporte, um aminoácido de cada vez, por meio de um conjunto padrão de reações em um ciclo repetitivo (**Figura 3-32**). Em cada etapa sucessiva do processo cíclico, grupos químicos de proteção bloqueiam as reações indesejadas.

Atualmente, essa tecnologia de síntese química de peptídeos químicos está automatizada. Uma limitação importante

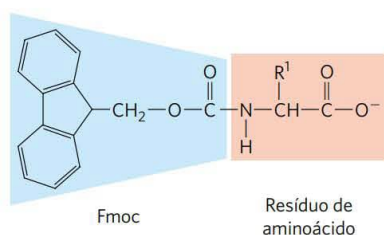


FIGURA 3-32 Síntese química de um peptídeo em um suporte de polímero insolúvel. As reações de 1 a 4 são necessárias para a formação de cada ligação peptídica. O grupo 9-fluorenilmetoxicarbônico (Fmoc) (sombreado em azul) impede reações indesejadas no grupo α -amino do resíduo (sombreado em cor salmão). A síntese química prossegue da extremidade carboxila para a extremidade amino, sentido inverso da síntese proteica *in vivo* (Capítulo 27).

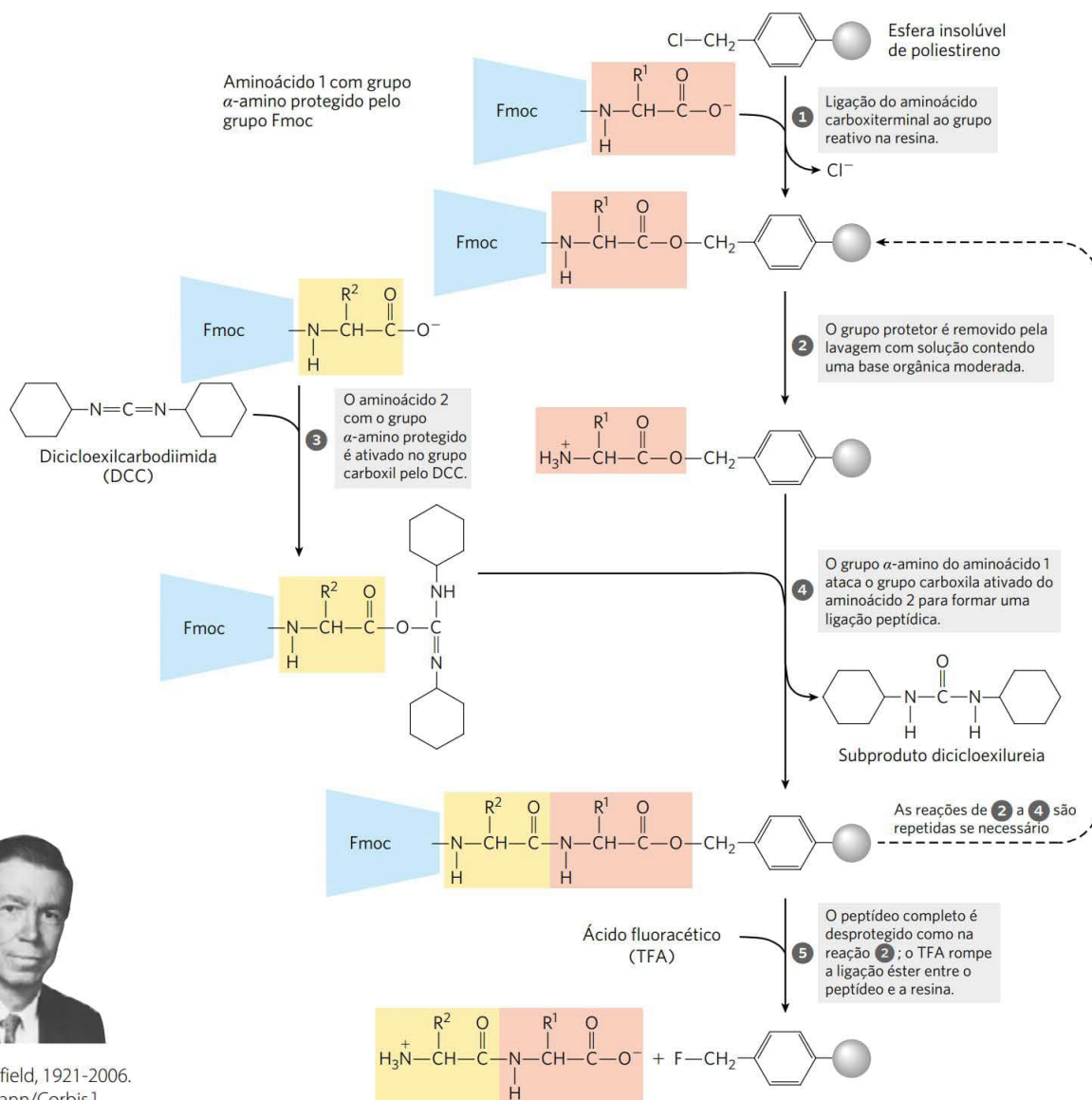


TABELA 3-7 Efeito do rendimento de cada etapa no rendimento global da síntese de peptídeos

Número de resíduos no polipeptídeo final	Rendimento geral do peptídeo final (%) quando o rendimento de cada etapa é:	
	96%	99,8%
11	66	98
21	44	96
31	29	94
51	13	90
100	1,8	82

do processo (limitação que o processo de sequenciamento da degradação de Edman também tem) é a eficiência de cada ciclo químico. Isso se torna evidente quando se calcula a produção total de peptídeos de vários comprimentos comparando um rendimento de cada etapa de adição de novo aminoácido em 96% com um rendimento de 99,8% (Tabela 3-7). A reação incompleta em uma fase pode levar à formação de uma impureza (na forma de um peptídeo mais curto) na etapa seguinte. A química foi otimizada para permitir a síntese proteica de 100 resíduos de aminoácidos em poucos dias e com rendimento razoável. Uma abordagem muito parecida é utilizada para a síntese de ácidos nucleicos (ver Figura 8-33). É interessante observar que essa tecnologia, mesmo impressionante como ela é, está muitíssimo longe de se equiparar aos processos biológicos. Uma célula bacteriana poderia sintetizar a mesma proteína de 100 resíduos com uma fidelidade extraordinária em cerca de 5 segundos.

Vários métodos novos para a ligação (união) eficiente de peptídeos tornaram possível ligar peptídeos sintéticos em polipeptídeos maiores e proteínas. Com esses métodos, novas formas de proteínas podem ser criadas com grupos químicos posicionados precisamente, incluindo aquelas que normalmente não são encontradas como proteínas celulares. Essas novas formas fornecem novos caminhos para testar teorias de catálise enzimática, para criar proteínas com novas propriedades químicas e para planejar sequências de proteínas que irão se enovelar em estruturas particulares. Esta última aplicação se constitui na confirmação mais atual de nossa capacidade crescente de relacionar a estrutura primária de um peptídeo com a estrutura tridimensional que ele assume em solução.

As sequências de aminoácidos fornecem importantes informações bioquímicas

O conhecimento da sequência de aminoácidos em uma proteína pode dar ideias sobre sua estrutura tridimensional e função, localização celular e evolução. A maioria dessas ideias vem da procura de semelhanças entre uma proteína de interesse e proteínas estudadas anteriormente. Milhares de sequências são conhecidas e estão disponíveis em bancos de dados acessíveis pela internet. A comparação de uma sequência recentemente obtida com este grande banco de sequências armazenadas geralmente revela relações que são tanto surpreendentes quanto esclarecedoras.

Não se sabe ainda em detalhes como uma sequência de aminoácidos determina uma estrutura tridimensional e tampouco é possível sempre prever a função a partir da sequência. Entretanto, famílias de proteínas com algumas características estruturais ou funcionais em comum podem ser prontamente identificadas com base nas semelhanças entre suas sequências de aminoácidos. Proteínas individuais são associadas a famílias com base no grau de semelhança nas sequências de aminoácidos. Membros de uma família são geralmente idênticos em 25% ou mais nas sequências, e as proteínas dessas famílias geralmente compartilham em comum pelo menos algumas características estruturais e funcionais. Algumas famílias são definidas, no entanto, pelas identidades envolvendo somente alguns poucos resíduos de aminoácidos que são cruciais para uma determinada função. Diversas subestruturas semelhantes, ou “domínios” (estão definidos com mais detalhes no Capítulo 4), ocorrem em muitas proteínas cujas funções não têm relação entre si. Esses domínios geralmente se enovelam em configurações estruturais que possuem um grau incomum de estabilidade ou que são especializadas para um ambiente específico. Relações evolutivas também podem ser inferidas a partir das semelhanças estruturais e funcionais entre famílias de proteínas.

Certas sequências de aminoácidos funcionam como sinais que determinam a localização celular, a modificação química e a meia-vida de uma proteína. Sequências de sinalização específicas, geralmente na porção aminoterminal, são utilizadas para direcionar certas proteínas para a exportação a partir da célula; outras proteínas são direcionadas para o núcleo, para a superfície celular, o citosol ou ainda outras localizações celulares. Outras sequências atuam como sítios de ligação para grupos prostéticos, como os grupos de açúcares em glicoproteínas e lipídeos em lipoproteínas. Alguns desses sinais são bem caracterizados e são facilmente reconhecíveis nas sequências de proteínas recém-caracterizadas (Capítulo 27).

>> Convenção-chave: muito da informação funcional embutida nas sequências de proteínas está na forma de **sequências-consenso**. Esse termo é aplicado a sequências de DNA, RNA ou proteínas. Quando uma série de sequências de ácidos nucleicos ou de proteínas relacionadas é comparada, a sequência-consenso é aquela que reflete a base ou o aminoácido mais frequente em cada posição. Partes da sequência que apresentam concordância especialmente boa geralmente representam domínios funcionais conservados evolutivamente. Diversas ferramentas matemáticas disponíveis na internet podem ser utilizadas para gerar sequências-consenso ou identificá-las nos bancos de dados de sequências. O Quadro 3-2 ilustra convenções comuns para a apresentação de sequências-consenso. <<

Sequências de proteínas podem elucidar a história da vida na Terra

A simples cadeia de letras que indica a sequência de aminoácidos de uma proteína tem uma riqueza surpreendente de informações. À medida que mais sequências de proteínas ficam disponíveis, desenvolver métodos mais poderosos para extrair informações a partir de sequências passou a ser um desafio importantíssimo para a bioquímica. A análise das informações disponíveis nos muitos e sempre crescentes

QUADRO 3-2 Sequências-consenso e logos de sequências

Sequências-consenso podem ser representadas de várias maneiras. Para ilustrar dois tipos de convenção, serão usados dois exemplos de sequências-consenso (Figura 1); a estrutura de ligação a ATP denominada alça P (ver Quadro 12.2) e a estrutura de ligação a Ca^{2+} denominada mão EF (ver Figura 12-12). As regras descritas aqui foram adaptadas daquelas utilizadas pela comparação de sequências do *website* PROSITE (http://prosite.expasy.org/sequence_logo.html) e usam os códigos padrão de uma letra para cada aminoácido.

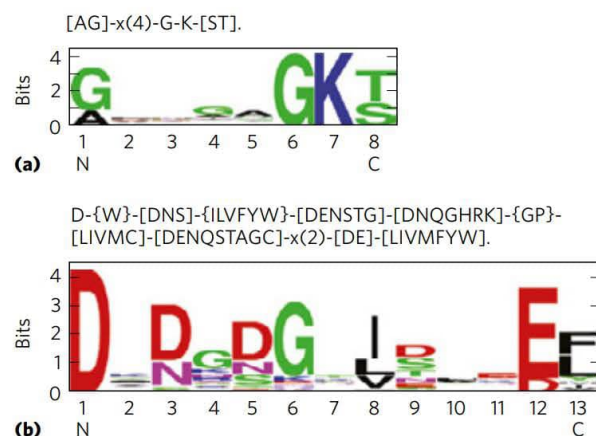


FIGURA Q-1 Representações de duas sequências-consenso. (a) Alça P, estrutura que liga ATP; (b) mão EF, estrutura que liga Ca^{2+} . [Fontes: os dados das sequências de (a) estão no documento ID PDOC00017, e os de (b), no documento ID PDOC00018, www.expasy.org/prosite, N. Hulo et al., *Nucleic Acids Res.* 34:D227, 2006. Logos de sequência criados com WebLogo, <http://weblogo.berkeley.edu>, G. E. Crooks et al., *Genome Res.* 14:1188, 2004.

Em uma das maneiras de designar consenso, mostrada na parte superior de (a) e (b), cada posição é separada de seu vizinho por um hífen. Uma posição que permite qualquer aminoácido é designada x. As ambiguidades são indicadas listando os aminoácidos aceitáveis para uma determinada posição entre colchetes. Por exemplo, em (a) [AG] significa Ala ou Gly. Se todos, exceto

alguns, aminoácidos são permitidos em uma posição, os aminoácidos *não* permitidos são listados entre chaves. Por exemplo, em (b), {W} significa qualquer aminoácido, exceto Trp. A repetição de um elemento no padrão é indicada seguindo esse elemento com um número ou uma série de números entre parênteses. Em (a), por exemplo, x (4) significa x-x-x-x; x (2,4) significa x-x ou x-x-x ou x-x-x-x. Quando um padrão é restrito ao grupo amino ou carboxila terminais de uma sequência, esse padrão começa com < ou termina com >, respectivamente (não é o caso dos dois exemplos citados). Um ponto marca o final do padrão. Aplicando-se essas regras à sequência-consenso em (a), tanto A como G podem ser encontrados na primeira posição. Qualquer aminoácido pode ocupar as quatro próximas posições, seguidos por um G e um K invariáveis. A última posição pode ser um S ou T.

Logos de sequência fornecem uma representação mais informativa e gráfica de um aminoácido (ou ácido nucleico) em um alinhamento múltiplo de sequências. Cada logo consiste em uma sobreposição de símbolos para cada posição na sequência. A altura total dessa sobreposição de símbolos (em bits) indica o grau de conservação da sequência naquela posição, ao passo que a altura de cada símbolo na pilha indica a frequência relativa daquele aminoácido ou (nucleotídeo). Para sequências de aminoácidos, as cores representam as características do aminoácido: polar (G, S, T, Y, C, Q, N), verde; básico (K, R, H), azul; ácido (D, E), vermelho; e hidrofóbico (A, V, L, I, P, W, F, M), preto. Neste esquema, a classificação de aminoácidos é um pouco diferente daquela na Tabela 3-1 e na Figura 3-5. Os aminoácidos com cadeias laterais aromáticas são agrupados junto com os apolares (F, W) e polares (Y). A glicina, sempre difícil de agrupar, é colocada no grupo polar. Observe que quando vários aminoácidos são aceitáveis em uma posição específica, eles raramente ocorrem com igual probabilidade. Em geral, um ou alguns poucos predominam. A representação logo mostra claramente quais predominam, e a sequência conservada de uma proteína torna-se óbvia. Entretanto, o logo obscurece alguns resíduos de aminoácidos que podem ser permitidos em uma posição, como Cys, que ocorre ocasionalmente na posição 8 da mão EF em (b).

bancos de dados biológicos, incluindo sequências de genes e proteínas e as estruturas de macromoléculas, deram origem ao novo campo da **bioinformática**. Uma das contribuições dessa disciplina é o conjunto cada vez maior de programas de computador, disponibilizados rapidamente na internet e que podem ser utilizados por qualquer cientista, estudante ou leigo interessado no assunto. A função de cada proteína depende da sua estrutura tridimensional, que, por sua vez, é determinada em grande parte por sua estrutura primária. Portanto, a informação transmitida pela sequência de uma proteína é limitada apenas por nossa própria compreensão dos princípios estruturais e funcionais. As ferramentas de bioinformática em constante evolução tornam possível identificar quais são os segmentos funcionais em novas proteí-

nas e ajudam a estabelecer tanto as sequências quanto as relações estruturais com proteínas que já se encontram nos bancos de dados. Em um nível diferente de investigação, as sequências de proteínas estão começando a nos explicar como as proteínas evoluíram e, em última instância, como a vida evoluiu na Terra.

O campo da evolução molecular é frequentemente relacionado a Emile Zuckerkandl e Linus Pauling, cujos trabalhos, em meados de 1960, introduziram o uso de sequências de nucleotídeos e proteínas para investigar a evolução. A premissa não é tão simples quanto aparenta. Se dois organismos estão relacionados proximamente, as sequências de seus genes e proteínas devem ser semelhantes. As sequências divergem crescentemente à medida que a distân-

cia evolutiva entre dois organismos aumenta. As promessas dessa abordagem começaram a se confirmar na década de 1970, quando Carl Woese utilizou sequências de RNA ribossomal para definir as arqueias como um grupo de organismos vivos distinto de bactérias e eucariotos (ver Figura 1-5). As sequências de proteínas oferecem uma oportunidade para refinar significativamente a informação disponível. Com o advento de projetos de genoma investigando organismos, desde bactérias até o homem, o número de sequências disponíveis está crescendo a uma velocidade enorme. Essa informação pode ser utilizada para traçar a história biológica. O desafio é aprender a ler os hieróglifos genéticos.

A evolução não percorreu um caminho linear simples. As complexidades são enormes para qualquer tentativa de extrair a informação evolutiva armazenada em sequências de proteínas. Para determinada proteína, os resíduos de aminoácidos essenciais para a atividade da proteína são conservados ao longo do tempo da evolução. Os resíduos menos importantes para a função podem variar ao longo do tempo – isto é, um aminoácido pode ser substituído por outro –, e esses resíduos variáveis podem fornecer informação para seguir o caminho percorrido pela evolução. Entretanto, as substituições de aminoácidos não são sempre aleatórias. Em algumas posições na estrutura primária, a necessidade de manter a função proteica pode levar a que apenas determinadas substituições de aminoácidos possam ser toleradas. Algumas proteínas têm resíduos de aminoácidos mais variáveis que outras. Por essas e outras razões, proteínas diferentes podem evoluir em velocidades diferentes.

Outro fator complicador em traçar a história evolutiva é a transferência de um gene ou grupo de genes de um organismo para outro, um processo raro denominado **transferência gênica horizontal**. Os genes transferidos podem ser muito semelhantes aos genes dos quais eles foram derivados no organismo original, enquanto a maioria dos demais genes desses mesmos dois organismos pode ter uma relação muito distante. Um exemplo de transferência gênica horizontal é a rápida dispersão de genes de resistência a antibióticos em populações bacterianas que ocorreu recentemente. As proteínas derivadas desses genes transferidos não seriam bons candidatos para o estudo da evolução bacteriana, pois compartilham apenas uma história evolutiva muito limitada com seus organismos “hospedeiros”.

O estudo da evolução molecular geralmente se concentra em famílias de proteínas muito relacionadas. Na maior parte dos casos, as famílias escolhidas para análise têm funções essenciais no metabolismo celular e devem ter estado presentes desde as primeiras células viáveis, reduzindo, portanto, enormemente a chance de que tenham sido introduzidas há relativamente pouco tempo por transferência gênica horizontal. Por exemplo, uma proteína chamada de EF-1 α (fator de alongamento 1 α) está envolvida na síntese proteica em todos os eucariotos. Uma proteína semelhante, EF-Tu, com a mes-

ma função, é encontrada em bactérias. As semelhanças nas sequências e nas funções indicam que a EF-11 α e a EF-Tu são membros de uma família de proteínas que compartilham um ancestral comum. Os membros de famílias de proteínas são denominados **proteínas homólogas**, ou **homólogos**. O conceito de homólogo pode ser mais refinado. Se duas proteínas em uma família (i.e., dois homólogos) estão presentes na mesma espécie, elas são chamadas de **parálogos**. Homólogos de espécies diferentes são denominados **ortólogos**. O processo de rastrear a evolução envolve, primeiramente, a identificação de famílias adequadas de proteínas homólogas e depois utilizá-las para reconstruir vias evolutivas.

Os homólogos são identificados pelo uso de programas de computador cada vez mais poderosos que comparam diretamente duas ou mais sequências de proteínas escolhidas ou pesquisam vastos bancos de dados para descobrir os parentes evolutivos da sequência proteica selecionada. O processo de busca eletrônica pode ser entendido como o deslizamento de uma sequência sobre outra até que seja encontrada uma seção com boa correspondência. Nesse alinhamento de sequências, uma pontuação positiva é atribuída para cada posição onde os resíduos de aminoácidos nas duas sequências são idênticos – o valor da pontuação varia de um programa para o outro – e isso dá uma medida da qualidade do alinhamento. O processo tem certas complicações. Algumas vezes as proteínas comparadas apresentam correspondência, por exemplo, em dois segmentos de sequência, e esses segmentos estão conectados por sequências menos relacionadas de comprimentos diferentes. Assim, os dois segmentos correspondentes não podem ser alinhados ao mesmo tempo. Para contornar isso, o programa de computador introduz “lacunas” em uma das sequências para mostrar os segmentos que coincidem (**Figura 3-33**). É claro que, se for introduzido um número suficiente de lacunas, quaisquer duas sequências poderiam ser colocadas em algum tipo de alinhamento. Para evitar alinhamentos sem informações significativas, os programas incluem penalidades para cada lacuna introduzida, reduzindo, portanto, a pontuação global do alinhamento. Com um método de tentativa e erro eletrônico, o programa seleciona o alinhamento com a pontuação ideal que maximiza os resíduos de aminoácidos idênticos enquanto minimiza a introdução de lacunas.

Com frequência, encontrar aminoácidos idênticos não é adequado para identificar proteínas relacionadas ou, principalmente, para determinar o quanto as proteínas estão relacionadas em uma escala de tempo da evolução. Uma análise mais útil também leva em conta as propriedades químicas dos aminoácidos substituídos. Muitas das diferenças de aminoácidos no interior de uma família de proteínas podem ser conservativas – isto é, um resíduo de aminoácido é substituído por um resíduo com propriedades químicas semelhantes. Por exemplo, um resíduo Glu pode substituir em um membro da família o resíduo Asp encontrado em outra;

```

Escherichia coli  T G N R T I A V Y D L G G G T F D I S I I E I D E V D G E K T F E V L A T N G D T H L G G E D F D S R L I N Y L
Bacillus subtilis D E D Q T I L L Y D L G G G T F D V S I L E L G D G V F E V R S T A G D N R L G G D F D Q V I D H L

```

Intervalo

FIGURA 3-33 Alinhando sequências de proteínas com o uso de intervalos. A figura mostra o alinhamento das sequências de uma curta seção das proteínas Hsp70 (classe muito difundida de chaperonas dobradoras de proteínas) de duas espécies de bactérias muito bem estudadas, *E. coli* e *Bacillus subtilis*. A introdução de um intervalo na sequência de *B. subtilis* permite um melhor alinhamento dos resíduos de aminoácidos de cada lado do intervalo. Resíduos de aminoácidos idênticos estão sombreados. [Fonte: informações de R. S. Gupta, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:1435, 1998, Fig. 2.]

ambos os aminoácidos são carregados negativamente. Uma substituição conservada deve, logicamente, receber uma pontuação maior em um alinhamento de sequências do que uma substituição não conservada, como a substituição de um resíduo Asp por um resíduo hidrofóbico Phe.

Na maioria dos esforços para encontrar homologias e explorar relações evolutivas, o uso de sequências de proteínas (derivadas tanto diretamente do sequenciamento proteico quanto do sequenciamento do DNA que codifica as proteínas) é mais apropriado do que o uso de sequências de ácidos nucleicos não gênicas (aquelas que não codificam uma proteína ou um RNA funcional). Para um ácido nucleico, com seus quatro tipos diferentes de resíduos, o alinhamento aleatório de sequências não homólogas geralmente produzirá correspondências para, no mínimo, 25% das posições. A introdução de algumas poucas lacunas pode, com frequência, aumentar a fração de resíduos correspondentes para 40% ou mais, e a probabilidade de alinhamentos aleatórios entre sequências não relacionadas se torna bastante alta. Os 20 resíduos de aminoácidos nas proteínas reduzem muito a probabilidade de alinhamentos aleatórios desse tipo e que não dão informação alguma.

Os programas utilizados para gerar um alinhamento de sequências são complementados por métodos que testam a confiabilidade dos alinhamentos. Um teste computadorizado comum consiste em embaralhar a sequência de aminoácidos de uma das proteínas que estiver sendo comparada, para produzir uma sequência aleatória e, então, instruir o programa a alinhar a sequência embaralhada com a outra, não embaralhada. Dá-se pontuações para o novo alinhamento, e o processo de embaralhar e alinhar é repetido muitas vezes. O alinhamento original, antes de embaralhado, deve ter uma pontuação significativamente maior do que qualquer uma daquelas pontuações geradas pelos alinhamentos aleatórios; isso aumenta a confiança de que o alinhamento de sequências identificou um par de homólogos. Observe que a ausência de pontuação de alinhamento significativo não necessariamente significa que não exista relação evolutiva entre as duas proteínas. Como será visto no Capítulo 4, as semelhanças de estruturas tridimensionais revelam algumas vezes relações evolutivas nas quais a homologia de sequências foi apagada pelo tempo.

Para utilizar uma família de proteínas para explorar a evolução, os pesquisadores identificam membros da família com funções moleculares semelhantes em uma faixa mais ampla possível de organismos. A informação da família pode, então, ser utilizada para rastrear a evolução desses organismos. Ao analisar a divergência nas sequências das famílias de proteínas selecionadas, os investigadores podem separar

os organismos em classes com base em suas relações evolutivas. Essa informação deve ser conciliada com exames mais clássicos da fisiologia e da bioquímica dos organismos.

Certos segmentos de uma sequência de proteínas podem ser encontrados em organismos de um grupo taxonômico, mas não em outros grupos. Esses segmentos podem ser utilizados como **sequências-assinatura** para o grupo no qual elas foram encontradas. Um exemplo de uma sequência-assinatura é a inserção de 12 aminoácidos próximos ao aminoterminal das proteínas EF-1 α /EF-Tu em todas as arqueias e eucariotos, mas não em bactérias (**Figura 3-34**). Essa assinatura particular é um dos muitos indícios bioquímicos que podem ajudar a estabelecer as relações da evolução dos eucariotos e das arqueias. Sequências-assinatura vêm sendo utilizadas para estabelecer relações evolutivas entre grupos de organismos em muitos níveis taxonômicos diferentes.

Ao considerar a sequência completa de uma proteína, os pesquisadores podem atualmente construir árvores evolutivas mais elaboradas com muitas espécies em cada grupo taxonômico. A **Figura 3-35** apresenta uma dessas árvores para bactérias, com base na divergência de sequências na proteína GroEL (proteína presente em todas as bactérias que auxilia no enovelamento adequado de proteínas). A árvore pode ser aperfeiçoada utilizando-se as sequências de muitas proteínas e complementa a informação da sequência com dados sobre as propriedades bioquímicas e fisiológicas exclusivas de cada espécie. Há muitos métodos para gerar árvores, cada método com suas próprias vantagens e desvantagens, e diversas formas de representar as relações evolutivas resultantes. Na **Figura 3-35**, as extremidades livres das linhas são chamadas de “nós externos”; cada um representa uma espécie atual e cada uma está identificada. Os pontos onde duas linhas se unem, os “nós internos”, representam espécies ancestrais extintas. Na maior parte das representações (incluindo a **Figura 3-35**), os comprimentos das linhas que conectam os nós são proporcionais ao número de substituições de aminoácidos que separam uma espécie da outra. Ao examinar duas espécies existentes com um nó interno comum (representando o ancestral comum das duas espécies), o comprimento do ramo que conecta cada nó externo ao nó interno representa o número de substituições de aminoácidos que separam uma espécie extinta de seu ancestral. A soma dos comprimentos de todos os segmentos de linhas que conectam uma espécie conservada a outras espécies conservadas com ancestral comum reflete o número de substituições que separam as duas espécies conservadas. Para determinar quanto tempo foi necessário para as várias espécies divergirem, a árvore precisa ser calibrada para compará-la com informações de registros fósseis e outras fontes.

		Sequência-assinatura	
Arqueobactérias	<i>Halobacterium halobium</i>	IGHVDHGKST MVGR	LYETG SVPEHV I EQH
	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	IGHVDHGKST LVGR	LMDRG FIDEKT VKEA
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGHVDS GKST TTGH	IYKCG GIDKRT IEKF
Eucariotos	<i>Homo sapiens</i>	IGHVDS GKST TTGH	IYKCG GIDKRT IEKF
Bactérias gram-positivas	<i>Bacillus subtilis</i>	IGHVDHGKTT LTAA	ITTV
Bactérias gram-negativas	<i>Escherichia coli</i>	IGHVDHGKTT LTAA	ITTV

FIGURA 3-34 Uma sequência-assinatura na família de proteínas EF-1 α /EF-Tu. A sequência-assinatura (no retângulo) é uma inserção de 12 resíduos próxima do terminal amino da sequência. Os resíduos que alinham em todas as espécies estão sombreados. Essa sequência-assinatura está presente tanto nas arqueias como nos eucariotos, embora as sequências de inserções sejam bem distintas para os dois grupos. A variação na sequência-assinatura reflete a divergência evolutiva importante que ocorreu nesse ponto desde que essa sequência-assinatura apareceu pela primeira vez em um ancestral comum de ambos os grupos. [Fonte: informações de R. S. Gupta, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:1435, 1998, Fig. 7.]

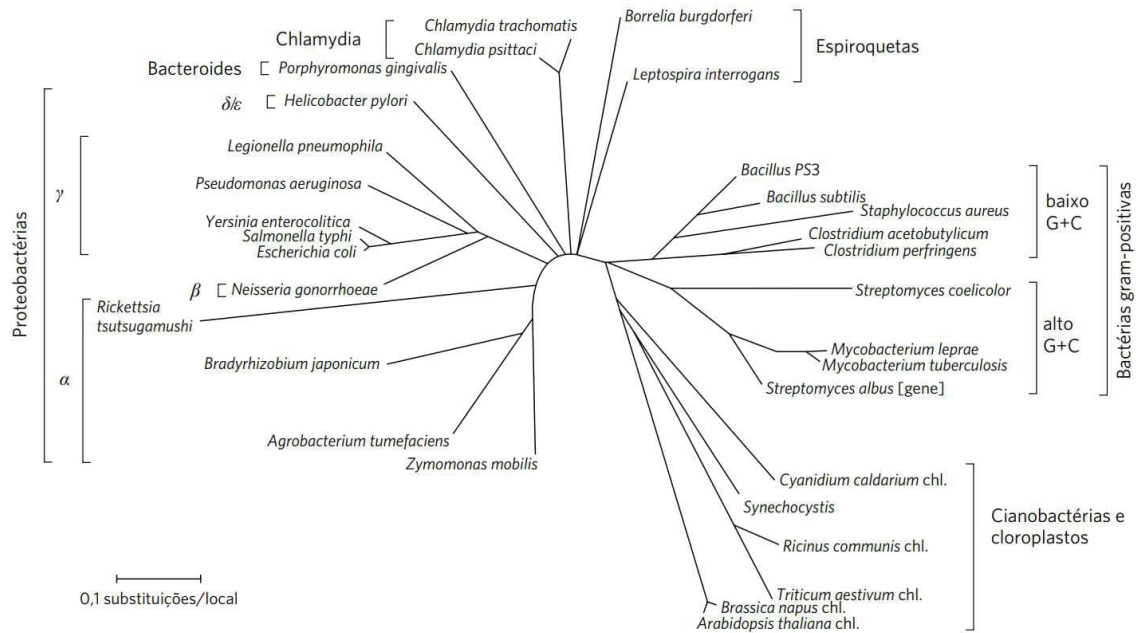


FIGURA 3-35 Árvore evolutiva derivada de comparações entre as sequências de aminoácidos. Árvore evolutiva bacteriana, com base na divergência de sequências observadas na família de proteínas GroEL. Também estão incluídos nessa árvore (parte inferior direita) os cloroplastos de algumas espécies não bacterianas. [Fonte: informações de R. S. Gupta, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:1435, 1998, Fig. 11.]

À medida que mais informação de sequência se torna disponível nos bancos de dados, é possível gerar árvores evolutivas com base em muitas proteínas, bem como aperfeiçoar essas árvores à medida que mais informação genômica emerge de métodos de análise cada vez mais sofisticados. Todo esse trabalho tem o objetivo de criar uma árvore detalhada da vida

que descreva a evolução e o parentesco de cada organismo na Terra. A história é um trabalho em execução, é claro (**Figura 3-36**). Levantar e responder essas questões é fundamental para definir como a humanidade vê a si mesma e o mundo ao seu redor. O campo da evolução molecular promete estar entre as mais vibrantes fronteiras científicas do século XXI.

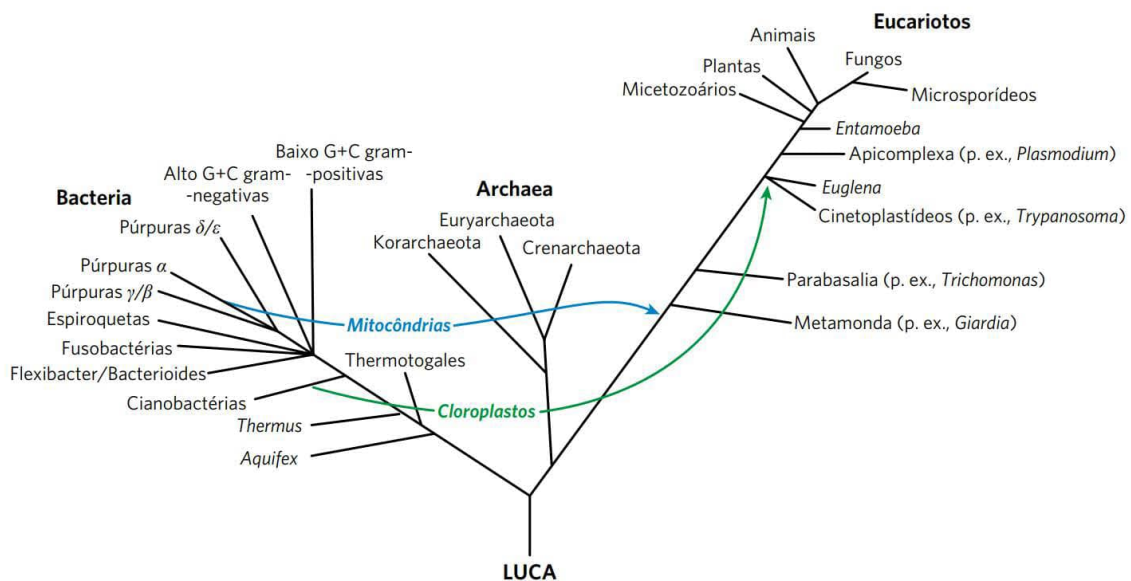


FIGURA 3-36 Árvore de consenso da vida. A árvore mostrada aqui baseia-se em análises de muitas sequências de proteínas e características genômicas adicionais. A árvore apresenta apenas uma parte da informação disponível, bem como apenas uma fração dos temas que ainda precisam ser solucionados. Cada grupo existente mostrado na árvore é uma história evolutiva complexa em si mesma. LUCA é o último ancestral comum universal do qual todas as outras formas de vida evoluíram. As setas azul e verde indicam a assimilação endossimbiótica de tipos específicos de bactérias por células eucarióticas para se tornarem mitocôndrias e cloroplastos, respectivamente (ver Figura 1-40). [Fonte: informações de F. Delsuc et al., *Nature Rev. Genet.* 6:363, 2005, Fig. 1.]

RESUMO 3.4 A estrutura de proteínas: estrutura primária

- Diferenças na função das proteínas resultam de diferenças na composição e na sequência de aminoácidos. Algumas variações na sequência podem ocorrer em determinada proteína com pouco ou nenhum efeito sobre sua função.
- As sequências de aminoácidos são deduzidas pela fragmentação de polipeptídeos em peptídeos menores usando reagentes que se sabe clivarem ligações peptídicas específicas pela determinação das sequências de aminoácidos de cada fragmento pelo procedimento automatizado de degradação de Edman e, então, organizando os fragmentos peptídicos pelo encontro de sobreposições de sequências entre os fragmentos gerados pelos diferentes reagentes. A sequência de uma proteína também pode ser deduzida a partir da sequência de nucleotídeos do gene correspondente no DNA ou então por espectrometria de massas.
- Peptídeos e proteínas pequenos (até cerca de 100 resíduos) podem ser sintetizados quimicamente. O peptídeo é construído, um resíduo de aminoácido por vez, enquanto permanece ligado a um suporte sólido.
- Sequências proteicas são uma fonte rica de informação sobre a estrutura e a função da proteína, bem como sobre a evolução da vida na Terra. Métodos sofisticados estão sendo desenvolvidos para rastrear a evolução, analisando as lentas mudanças que ocorrem nas sequências de aminoácidos de proteínas homólogas.

Termos-chave

Termos em **negrito** estão definidos no glossário.

aminoácidos 75	fracionamento 89
resíduo 75	diálise 90
grupo R 75	cromatografia em coluna 90
centro quiral 76	cromatografia de troca iônica 90
enantiômeros 76	cromatografia de exclusão por tamanho 92
configuração absoluta 77	cromatografia de afinidade 92
sistema D, L 77	cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) 92
polaridade 78	eletroforese 92
absorbância, A 80	dodecil sulfato de sódio (SDS) 94
zwitterion 81	focalização isoeletrica 94
pH isoeletrico (ponto isoeletrico, pI) 84	atividade específica 95
peptídeo 85	estrutura primária 97
proteína 85	estrutura secundária 97
ligação peptídica 85	estrutura terciária 97
oligopeptídeo 86	estrutura quaternária 97
polipeptídeo 86	degradação de Edman 98
proteína oligomérica 87	proteases 100
protômero 87	MALDI MS 101
proteína conjugada 89	
grupo prostético 89	
extrato bruto 89	
fração 89	

ESI MS 101

sequência-consenso 104

bioinformática 105

transferência gênica horizontal 106

proteínas homólogas 106

homólogos 106

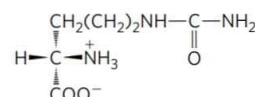
parálogos 106

ortólogos 106

sequência-assinatura 107

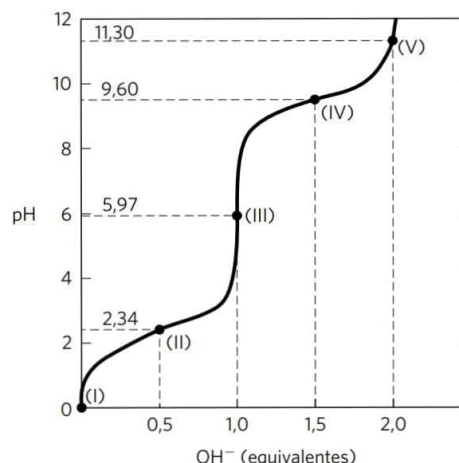
Teste seu conhecimento

1. Configuração absoluta da citrulina A citrulina isolada de melancia tem a estrutura apresentada a seguir. Ela é um aminoácido D ou L? Explique.

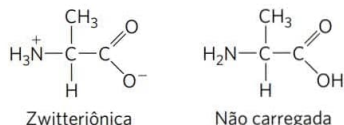


2. Relação entre a curva de titulação e as propriedades acidobásicas da glicina Uma solução de 100 mL de glicina 0,1 M em pH 1,72 foi titulada com uma solução de 2 M de NaOH. O pH foi monitorado e os resultados foram plotados como mostrado no gráfico. Os pontos-chave na titulação estão marcados de I a V. Para cada uma das afirmações seguintes, (a) a (o), *identifique* o ponto-chave adequado na titulação; *justifique* a escolha.

- A glicina predomina na forma $^+\text{H}_3\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOH}$.
- A *média* da carga líquida da glicina é $+\frac{1}{2}$.
- Metade dos grupos amino está ionizada.
- O pH é igual ao pK_a do grupo carboxila.
- O pH é igual ao pK_a do grupo amino protonado.
- A glicina tem capacidade tamponante máxima.
- A carga líquida *média* da glicina é zero.
- O grupo carboxila foi completamente titulado (primeiro ponto de equivalência).
- A glicina está completamente titulada (segundo ponto de equivalência).
- A espécie que predomina é $^+\text{H}_3\text{N}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$.
- A carga líquida *média* da glicina é -1 .
- A glicina está predominante como mistura de 50:50 de $^+\text{H}_3\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ e $^+\text{H}_3\text{N}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$.
- Esse é o ponto isoeletrico.
- Esse é o final da titulação.
- Essas são as *piores* regiões de pH para a capacidade tamponante.



3. Quanto da alanina está presente na forma da espécie completamente sem carga? Em um pH igual ao ponto isoelétrico da alanina, a carga *líquida* é zero. Duas estruturas podem ser desenhadas apresentando carga líquida igual a zero, mas a forma predominante de alanina em seu pI é zwitteriônica.



- (a) Por que a alanina é predominantemente zwitteriônica em vez de completamente não carregada em seu pI?
- (b) Que fração de alanina está na forma completamente não carregada em seu pI? Justifique as suposições.

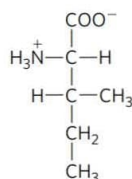
4. Estado de ionização da histidina Cada grupo ionizável de um aminoácido pode existir em um de dois estados, carregado ou neutro. A carga elétrica no grupo funcional é determinada pela relação entre o pK_a do grupo e o pH da solução. Essa relação é descrita pela equação de Henderson-Hasselbalch.

- (a) A histidina tem três grupos funcionais ionizáveis. Escreva as equações de equilíbrio para as três ionizações e assinale o pK_a adequado para cada ionização. Desenhe a estrutura da histidina em cada estado de ionização. Qual é a carga líquida na molécula de histidina em cada estado de ionização?
- (b) Desenhe as estruturas do estado de ionização predominante da histidina em pH 1, 4, 8 e 12. Observe que o estado de ionização pode ser aproximado tratando-se cada grupo ionizável independentemente.
- (c) Qual é a carga final da histidina em pH 1, 4, 8 e 12? Em cada pH, a histidina migrará em direção ao ânodo (+) ou ao cátodo (-) quando colocada em um campo elétrico?

5. Separação de aminoácidos por cromatografia de troca iônica Misturas de aminoácidos podem ser analisadas primeiramente pela separação da mistura nos componentes presentes por meio de cromatografia de troca iônica. Os aminoácidos inseridos em uma resina trocadora de cátions (ver Figura 3-17a) contendo grupos sulfonados ($-\text{SO}_3^-$) fluem pela resina em velocidades diferentes em consequência de dois fatores que influenciam seu movimento: (1) atração iônica entre os resíduos sulfonados da coluna com os grupos funcionais carregados positivamente nos aminoácidos e (2) interações hidrofóbicas entre as cadeias laterais de aminoácidos e o esqueleto fortemente hidrofóbico da resina de poliestireno. Para cada par de aminoácidos listados, determine qual será eluído primeiro em uma coluna permutadora de cátions processada com tampão de pH 7,0.

- (a) Aspartato e lisina.
 (b) Arginina e metionina.
 (c) Glutamato e valina.
 (d) Glicina e leucina.
 (e) Serina e alanina.

6. Nomeando os estereoisômeros de isoleucina A estrutura do aminoácido isoleucina é



- (a) Quantos centros quirais ela tem?
- (b) Quantos isômeros ópticos?
- (c) Desenhe fórmulas em perspectiva para todos os isômeros ópticos da isoleucina.

7. Comparação dos valores de K_a da alanina e da polialanina A curva de titulação da alanina mostra a ionização de dois grupos funcionais com valores de pK_a de 2,34 e 9,69, correspondendo à ionização do grupo carboxila e do grupo amino protonados, respectivamente. A titulação de di, tri e oligopeptídeos maiores de alanina também mostra a ionização de somente dois grupos funcionais, embora os valores experimentais de pK_a sejam diferentes. A tendência nos valores de pK_a está resumida na tabela.

Aminoácido ou peptídeo	pK_1	pK_2
Ala	2,34	9,69
Ala-Ala	3,12	8,30
Ala-Ala-Ala	3,39	8,03
Ala-(Ala) $_n$ -Ala, $n \geq 4$	3,42	7,94

- (a) Desenhe a estrutura de Ala-Ala-Ala. Identifique os grupos funcionais associados a pK_1 e pK_2 .
- (b) Por que o valor de pK_1 *aumenta* com cada resíduo Ala que é adicionado ao oligopeptídeo?
- (c) Por que o valor de pK_2 *diminui* com cada resíduo Ala a mais no oligopeptídeo?

8. O tamanho das proteínas Qual é a massa molecular aproximada de uma proteína com 682 resíduos de aminoácidos em uma única cadeia polipeptídica?

9. O número de resíduos de triptofano na albumina sérica bovina Uma análise quantitativa de aminoácidos revela que a albumina sérica bovina (BSA) contém 0,58% de triptofano (M_r 204) por peso.

- (a) Calcule a massa molecular *mínima* da BSA (i.e., supondo-se que haja apenas um resíduo de Trp por molécula de proteína).
- (b) A cromatografia de exclusão por tamanho da BSA fornece uma massa molecular estimada de 70.000. Quantos resíduos de Trp estão presentes em uma molécula de albumina sérica?

10. Composição de subunidades de uma proteína Uma proteína tem uma massa molecular de 400 kDa quando medida por cromatografia de exclusão por tamanho. Quando submetida a uma eletroforese em gel na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS), a proteína mostra três bandas com massas moleculares de 180, 160 e 60 kDa. Quando a eletroforese é realizada na presença de SDS e ditiotreitol, três bandas são novamente formadas, dessa vez com massas moleculares de 160, 90 e 60 kDa. Determine a composição das subunidades da proteína.

11. Carga elétrica líquida de peptídeos Um peptídeo tem a sequência



- (a) Qual é a carga final da molécula em pH 3, 8 e 11? (Utilize os valores de pK_a para cadeias laterais e grupos amino e carboxila terminais fornecidos na Tabela 3-1.)
- (b) Estime o pI deste peptídeo.

12. Ponto isoeletrico da pepsina Pepsina é o nome dado a uma mistura de diversas enzimas digestivas secretadas (como proteínas precursoras maiores) por células glandulares do estômago. Essas glândulas também secretam ácido clorídrico, que dissolve o material particulado do alimento, permitindo à pepsina clivar enzimaticamente as moléculas das proteínas. A mistura resultante do alimento, HCl e enzimas digestivas é conhecida como quimo e apresenta pH próximo a 1,5. Que valor de pI pode se prever para a proteína pepsina? Que grupos funcionais devem estar presentes para conferir esse pI à pepsina? Quais aminoácidos nas proteínas poderiam contribuir com esses grupos?

13. Ponto isoeletrico de histonas As histonas são proteínas encontradas no núcleo de células eucarióticas, fortemente ligadas ao DNA (que contém muitos grupos fosfato). O pI das histonas é muito alto, cerca de 10,8. Quais são os resíduos de aminoácidos que devem estar presentes em quantidades relativamente elevadas nas histonas? De que forma esses resíduos contribuem para a forte ligação das histonas ao DNA?

14. Solubilidade de polipeptídeos Um dos métodos de separação faz uso das diferenças de solubilidade. A solubilidade de polipeptídeos grandes em água depende da polaridade relativa dos grupos R, principalmente do número de grupos ionizáveis: quanto mais grupos ionizáveis existirem, mais solúvel será o polipeptídeo. Qual, de cada par de polipeptídeos a seguir, é mais solúvel no pH indicado?

- (a) (Gly)₂₀ ou (Glu)₂₀ em pH 7,0
- (b) (Lys-Ala)₃ ou (Phe-Met)₃ em pH 7,0
- (c) (Ala-Ser-Gly)₅ ou (Asn-Ser-His)₅ em pH 6,0
- (d) (Ala-Asp-Gly)₅ ou (Asn-Ser-His)₅ em pH 3,0

15. Purificação de enzimas Um bioquímico descobre e purifica uma nova enzima, gerando a tabela de purificação a seguir.

Procedimento	Proteína total (mg)	Atividade (unidades)
1. Extrato bruto	20.000	4.000.000
2. Precipitação (sal)	5.000	3.000.000
3. Precipitação (pH)	4.000	1.000.000
4. Cromatografia de troca iônica	200	800.000
5. Cromatografia de afinidade	50	750.000
6. Cromatografia de exclusão por tamanho	45	675.000

- (a) A partir das informações fornecidas na tabela, calcule a atividade específica da enzima após cada procedimento de purificação.
- (b) Qual dos procedimentos de purificação utilizados para essa enzima é mais eficaz (i.e., fornece o maior aumento relativo na pureza)?
- (c) Qual das etapas de purificação é menos efetiva?
- (d) Há alguma indicação, com base nos resultados apresentados na tabela, de que a enzima está pura após a etapa 6? O que mais poderia ser feito para estimar a pureza da preparação da enzima?

16. Diálise Uma proteína purificada está em um tampão Hepes (N-(2-hidróxi-etil)piperazina-N'-(ácido 2-etanossulfônico)) em pH 7 com 500 mM de NaCl. Uma amostra (1 mL) da solução de proteína é inserida em um tubo consituído por uma membrana de diálise e dialisado contra 1 L do mesmo tampão Hepes com 0 mM de NaCl. Moléculas pequenas e íons (como

Na⁺, Cl⁻ e Hepes) podem se difundir através da membrana de diálise, mas a proteína não.

- (a) Uma vez que a diálise alcança o equilíbrio, qual é a concentração de NaCl na amostra de proteína? Suponha que nenhuma mudança de volume ocorra na amostra durante a diálise.
- (b) Se a amostra de 1 mL original fosse dialisada duas vezes, sucessivamente, contra 100 mL do mesmo tampão Hepes com 0 mM NaCl, qual seria a concentração final de NaCl na amostra?

17. Purificação de peptídeos Em pH 7,0, em que ordem os três peptídeos a seguir seriam eluídos em uma coluna preenchida com um polímero permutador de cátions?

Peptídeo A: Ala 10%, Glu 5%, Ser 5%, Leu 10%, Arg 10%, His 5%, Ile 10%, Phe 5%, Tyr 5%, Lys 10%, Gly 10%, Pro 5% e Trp 10%.

Peptídeo B: Ala 5%, Val 5%, Gly 10%, Asp 5%, Leu 5%, Arg 5%, Ile 5%, Phe 5%, Tyr 5%, Lys 5%, Trp 5%, Ser 5%, Thr 5%, Glu 5%, Asn 5%, Pro 10%, Met 5% e Cys 5%.

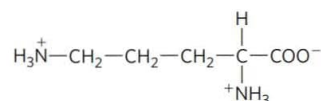
Peptídeo C: Ala 10%, Glu 10%, Gly 5%, Leu 5%, Asp 10%, Arg 5%, Met 5%, Cys 5%, Tyr 5%, Phe 5%, His 5%, Val 5%, Pro 5%, Thr 5%, Ser 5%, Asn 5% e Gln 5%.

18. Determinação da sequência do neuropeptídeo leucil-encefalina Um grupo de peptídeos que influencia a transmissão nervosa em certas partes do cérebro foi isolado de tecido cerebral normal. Esses peptídeos são conhecidos como opioides porque se ligam a receptores específicos que também se ligam a fármacos opiáceos, como a morfina e a naloxona. Os opioides, portanto, mimetizam algumas propriedades dos fármacos opiáceos. Alguns pesquisadores consideram que esses peptídeos sejam os analgésicos próprios do cérebro. Utilizando as informações a seguir, determine a sequência de aminoácidos do opioide leucil-encefalina. Explique como a estrutura é consistente com cada uma das informações fornecidas.

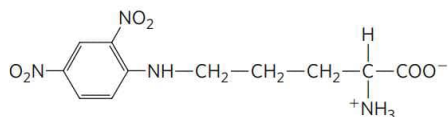
- (a) A hidrólise completa usando 6 M HCl a 110°C seguida por análise de aminoácidos indicou a presença de Gly, Leu, Phe e Tyr em relações molares de 2:1:1:1.
- (b) O tratamento do peptídeo com 1-flúor-2,4-dinitrobenzo seguido pela hidrólise completa e cromatografia indicou a presença de um derivado 2,4-dinitrofenila da tirosina. Nenhuma tirosina livre foi encontrada.
- (c) A digestão completa do peptídeo com quimotripsina seguida por cromatografia forneceu tirosina e leucina livres mais um tripeptídeo contendo Phe e Gly em uma proporção de 1:2.

19. Estrutura do peptídeo antibiótico de *Bacillus brevis* Extratos da bactéria *Bacillus brevis* contêm um peptídeo com propriedades antibióticas. Esse peptídeo forma complexos com íons metálicos e parece interromper o transporte iônico através de membranas celulares de outras espécies bacterianas, matando-as. A estrutura do peptídeo foi determinada a partir das seguintes observações,

- (a) A hidrólise ácida completa do peptídeo seguida de análise de aminoácidos produziu quantidades equimolares de Leu, Orn, Phe, Pro e Val. Orn é ornitina, um aminoácido que não está presente em proteínas, mas aparece em alguns peptídeos. Ela tem a seguinte estrutura:

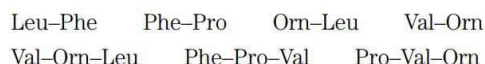


- (b) A massa molecular do peptídeo foi estimada em aproximadamente 1.200.
- (c) O peptídeo não sofreu hidrólise quando tratado com a enzima carboxipeptidase. Essa enzima catalisa a hidrólise do resíduo carboxiterminal de um polipeptídeo a menos que o resíduo seja Pro ou, por alguma razão, não contenha um grupo carboxila livre.
- (d) O tratamento do peptídeo intacto com 1-flúor-2,4-dinitrobenzeno, seguido por hidrólise completa e cromatografia, produziu apenas aminoácidos livres e o seguinte derivado:



(Dica: derivados de 2,4-dinitrofenila tem a ligação no grupo amino de uma cadeia lateral em vez de um grupo α -amino.)

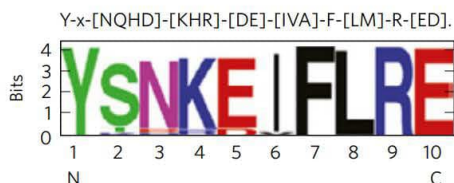
- (e) A hidrólise parcial do peptídeo seguida por separação cromatográfica e análise de sequência produziu os seguintes di e tripeptídeos (o aminoácido aminoterminal está sempre à esquerda):



A partir das informações fornecidas acima, deduza a sequência de aminoácidos do peptídeo antibiótico. Explique o raciocínio utilizado. Demonstre que a estrutura encontrada é consistente com *cada* uma das observações experimentais.

20. Eficiência no sequenciamento de peptídeos Um peptídeo com a estrutura primária Lys-Arg-Pro-Leu-Ile-Asp-Gly-Ala é sequenciado pelo procedimento de Edman. Se cada ciclo de Edman tiver uma eficiência de 96%, qual porcentagem dos aminoácidos liberados no quarto ciclo será leucina? Faça o cálculo uma segunda vez, mas supondo uma eficiência de 99% para cada ciclo.

21. Comparação de sequências Proteínas denominadas chaperonas moleculares (descritas no Capítulo 4) auxiliam no processo de enovelamento proteico. Uma classe de chaperonas encontrada em organismos, desde as bactérias até os mamíferos, é a proteína de choque térmico 90 (Hsp90). Todas as chaperonas Hsp90 contêm uma “sequência-assinatura” de 10 aminoácidos que permite uma identificação rápida dessas proteínas em bancos de dados de sequências. Duas representações dessa sequência-assinatura são apresentadas a seguir.



- (a) Nesta sequência, quais são os resíduos de aminoácidos que não variam (i.e., são conservados ao longo de todas as espécies)?
- (b) Qual(is) posição(ões) está(ão) limitada(s) apenas a aminoácidos com cadeias laterais carregadas positivamente? Para cada posição, qual aminoácido é o mais encontrado?
- (c) Quais posições estão restritas a substituições com aminoácidos com cadeias laterais carregadas negativamente? Qual aminoácido predomina em cada posição?

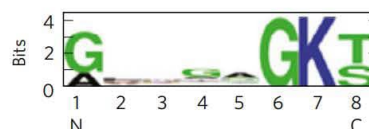
- (d) Há uma posição na qual pode ser encontrado qualquer aminoácido, embora um aminoácido apareça com muito mais frequência do que qualquer outro. Que posição é esta, e qual aminoácido aparece com mais frequência?

22. Métodos cromatográficos Três polipeptídeos, cujas sequências estão apresentadas a seguir (utilizando o código de uma letra para os aminoácidos) estão presentes em uma mistura:

1. ATKNRASCLVPKHGALMFWRHKQLVSDPIL
QKRQHILVCRNAAG
2. GPYFGDEPLDVHDEPEEG
3. PHLLSAWKGMIEGVGKSQSFAALIVILA

Qual deles migraria mais lentamente durante a cromatografia através de:

- (a) uma resina de troca iônica; grânulos revestidos com grupos carregados positivamente?
- (b) uma resina de troca iônica; grânulos revestidos com grupos carregados negativamente?
- (c) uma coluna de exclusão por tamanho (filtração em gel) projetada para separar peptídeos pequenos como esses?
- (d) Quais são os peptídeos que contêm os motivos de ligação ao ATP mostrados na sequência logo a seguir?

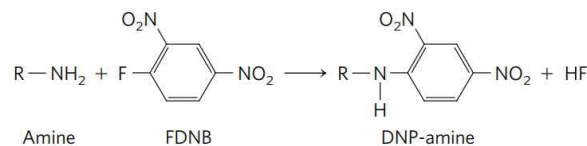


Problema de análise de dados

23. Determinação da sequência de aminoácidos da insulina A Figura 3-24 mostra a sequência de aminoácidos da insulina bovina. Essa estrutura foi determinada por Frederick Sanger e colaboradores. A maior parte desse trabalho está descrita em uma série de artigos publicados no *Biochemical Journal* de 1945 a 1955.

Quando Sanger e colaboradores iniciaram esse trabalho, em 1945, sabia-se que a insulina era uma proteína pequena constituída de duas ou de quatro cadeias polipeptídicas ligadas por ligações dissulfeto. Sanger e colaboradores desenvolveram alguns métodos simples para o estudo de sequências de proteínas.

Tratamento com FDNB. O FDNB (1-flúor-2,4-dinitrobenzeno) reage com grupos amino livres (exceto amida ou guanidina) em proteínas para produzir derivados dinitrofenil de aminoácidos:



Hidrólise ácida. Ferver uma proteína na presença de HCl a 10% por várias horas hidrolisa todas as suas ligações peptídicas e amídicas. Tratamentos com menor duração produzem polipeptídeos curtos; quanto mais longo o tratamento, mais completa é a quebra da proteína em seus aminoácidos.

Oxidação de cisteínas. O tratamento de uma proteína com ácido per fórmico clivou todas as ligações dissulfeto e converteu todos os resíduos Cys a resíduos de ácido cisteico (ver Figura 3-28).

Esta página foi deixada em branco intencionalmente.

Estrutura tridimensional das proteínas

- 4.1 Visão geral sobre a estrutura das proteínas 115
- 4.2 Estrutura secundária das proteínas 119
- 4.3 Estruturas terciária e quaternária das proteínas 125
- 4.4 Desnaturação e enovelamento das proteínas 142

As proteínas são moléculas grandes. O esqueleto covalente das proteínas é formado por centenas de ligações simples. Devido à livre rotação entre várias dessas ligações, a proteína consegue, em princípio, assumir um número de conformações praticamente incontável. Entretanto, o fato de cada proteína ter uma função química e uma estrutura específicas sugere que cada uma tenha uma estrutura tridimensional única (**Figura 4-1**). Quão estável é essa estrutura, quais são os fatores que guiam a formação das proteínas, o que mantém a estrutura coesa? No fim de 1920, várias proteínas foram cristalizadas, incluindo a hemoglobina (M_r 64.500) e a enzima urease (M_r 483.000). Como, em geral, o arranjo ordenado das moléculas em um cristal pode ocorrer somente se as unidades moleculares forem idênticas, a descoberta de que várias proteínas poderiam ser cristalizadas tornou evidente que até mesmo proteínas muito grandes são unidades químicas individuais com estruturas únicas. Essa conclusão revolucionou o pensamento sobre as proteínas e suas funções, porém o conhecimento que ela gerou era incompleto. A estrutura proteica é sempre maleável, algumas vezes de forma surpreendente. Mudanças na estrutura podem ser tão importantes para a função da proteína quanto a estrutura por si só.

Neste capítulo, será examinada a estrutura das proteínas. São enfatizados seis temas. Primeiro, a estrutura tridimensional de uma proteína é determinada por sua sequência de aminoácidos. Segundo, a função de uma proteína depende da sua estrutura. Terceiro, a maioria das proteínas isoladas existe em uma ou em um pequeno número de formas estruturalmente estáveis. Quarto, as forças mais importantes que estabilizam a estrutura específica de uma dada proteína são interações não covalentes, e o efeito hidrofóbico é especialmente importante para isso. Quinto, entre esse enorme número de estruturas únicas das proteínas, pode-se reconhecer alguns padrões estruturais comuns, os quais ajudam a organizar o entendimento sobre a arquitetura das proteínas. Sexto, as estruturas proteicas não são estáticas. Todas as proteínas passam por mudanças na conformação, variando desde mudanças sutis até mudanças enormes. Par-

tes de muitas proteínas possuem estruturas não discerníveis. Para algumas proteínas, a ausência de estrutura definida é fundamental para a função.

4.1 Visão geral sobre a estrutura das proteínas

O arranjo dos átomos de uma proteína, ou qualquer parte da proteína, no espaço é chamado de **conformação**. As conformações possíveis de uma proteína ou de qualquer segmento proteico incluem todos os estados que a sua estrutura pode assumir sem que nenhuma ligação covalente seja quebrada. Uma mudança conformacional pode ocorrer, por exemplo, pela rotação ao redor de ligações simples. Entre todas as conformações teoricamente possíveis em uma proteína com centenas de ligações simples, apenas uma ou (mais comumente) poucas predominam em condições biológicas. A necessidade de haver múltiplas conformações estáveis reflete as mudanças que devem ocorrer na proteína quando ela se liga a outras moléculas ou catalisa reações. As conformações que existem em determinadas condições são, normalmente, aquelas termodinamicamente mais estáveis – isto é, aquelas com energia livre de Gibbs (G) menores. Proteínas enoveladas, em qualquer uma das suas conformações funcionais, são chamadas de proteínas **nativas**.

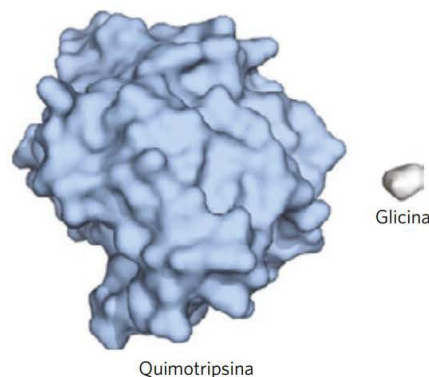


FIGURA 4-1 Estrutura da enzima quimotripsina, uma proteína globular. A molécula de glicina (em cinza) serve para comparar os tamanhos. As estruturas tridimensionais de proteínas que já se conhece estão arquivadas no Protein Data Bank – PDB (ver Quadro 4-4). Essa imagem foi elaborada utilizando os dados do PDB ID 6GCH. [Fonte: PDB ID 6GCH, K. Brady et al., *Biochemistry* 29:7600, 1990.]

Para a grande maioria das proteínas, uma estrutura em particular ou um pequeno grupo de estruturas é crucial para a função. No entanto, em muitos casos, partes das proteínas não têm estruturas fixas. Esses segmentos proteicos são intrinsecamente desordenados. Em alguns casos mais raros, proteínas inteiras são intrinsecamente desordenadas e ainda assim funcionais.

Quais os princípios que determinam as conformações mais estáveis de uma proteína? Um melhor entendimento da conformação das proteínas pode ser construído, passo a passo, a partir da discussão sobre estrutura primária no Capítulo 3 e considerando as estruturas secundárias, terciárias e quaternárias. A essa abordagem clássica, é preciso acrescentar a ênfase mais recente dada aos padrões comuns e classificáveis de enovelamento, variavelmente chamados de estruturas supersecundárias, enovelamentos ou motivos, que contribuem com um contexto organizacional importante para esse esforço complexo. A título de introdução, serão apresentados alguns princípios básicos.

A conformação de uma proteína é estabilizada por interações fracas

No contexto da estrutura de proteínas, o termo **estabilidade** pode ser definido como a tendência de manter a conformação nativa. Proteínas nativas estão perto do limite da estabilidade: o ΔG que separa os estados enovelado e não enovelado em uma proteína típica, sob condições fisiológicas, está na faixa de apenas 20 a 65 kJ/mol. Uma dada cadeia polipeptídica pode, teoricamente, assumir inúmeras conformações e, como resultado, o estado não enovelado de uma proteína é caracterizado por um alto grau de entropia conformacional. Essa entropia, junto com as interações decorrentes das ligações de hidrogênio entre os diversos grupos da cadeia polipeptídica com o solvente (água), tende a manter o estado não enovelado. As interações químicas que contrabalançam esses efeitos e estabilizam a conformação nativa incluem ligações dissulfeto (covalentes) e interações fracas (não covalentes), descritas no Capítulo 2: ligações de hidrogênio, o efeito hidrofóbico e interações iônicas.

Muitas proteínas não possuem ligações dissulfeto. O ambiente interno da maioria das células é altamente redutor devido à alta concentração de agentes redutores, como a glutatona, e, assim, a maior parte das sulfidrilas permanece no estado reduzido. Fora da célula, o ambiente é frequentemente mais oxidante e a formação de ligações dissulfeto é mais provável de ocorrer. Em eucariotos, ligações dissulfeto são encontradas, principalmente, em proteínas secretadas, isto é, proteínas extracelulares (p. ex., o hormônio insulina). As ligações dissulfeto também são incomuns em proteínas de bactérias. Entretanto, bactérias termofílicas, assim como arqueobactérias, geralmente apresentam várias proteínas com ligações dissulfeto, que as estabilizam. Presumivelmente, isso é uma adaptação para a vida a altas temperaturas.

Para todas as proteínas de todos os organismos, as interações fracas são extremamente importantes para o enovelamento das cadeias polipeptídicas em suas estruturas secundárias e terciárias. A associação de vários polipeptídeos para formar estruturas quaternárias também tem como base essas interações fracas.

Aproximadamente 200 a 460 kJ/mol são necessários para quebrar uma ligação covalente simples, ao passo que interações fracas podem ser rompidas com apenas 0,4 a 30 kJ/mol. Individualmente, uma ligação covalente, como as ligações dissulfeto conectando regiões distintas de uma única cadeia polipeptídica, é claramente muito mais forte que uma interação fraca. Entretanto, por serem muito numerosas, são as interações fracas que predominam como forças estabilizadoras da estrutura proteica. Em geral, a conformação proteica de energia livre mais baixa (i.e., de conformação mais estável) é aquela que apresenta o número máximo de interações fracas.

A estabilidade de uma proteína não é simplesmente o somatório das energias livres de formação das diversas interações fracas internas. Para cada ligação de hidrogênio formada durante o enovelamento de uma proteína, uma ligação de hidrogênio (de força equivalente) entre o mesmo grupo e a água é quebrada. A estabilidade resultante da contribuição de uma dada ligação de hidrogênio, ou a *diferença* de energia livre entre os estados enovelado e não enovelado, pode ser próxima de zero. Interações iônicas podem ser tanto estabilizadoras, quanto desestabilizadoras. Portanto, é preciso olhar em outros lugares para entender por que uma determinada conformação nativa é favorecida em detrimento de outras.

O exame cuidadoso da contribuição das interações fracas na estabilidade das proteínas deixa evidente que geralmente é o **efeito hidrofóbico** que predomina. A água pura contém uma rede de moléculas de H_2O ligadas por ligações de hidrogênio. Nenhuma outra molécula tem o potencial de ligação de hidrogênio da água, e a presença de outras moléculas na solução aquosa rompe estas ligações de hidrogênio. Quando a água envolve uma molécula hidrofóbica, o arranjo ótimo de ligação de hidrogênio resulta em uma camada de água altamente estruturada, ou **camada de solvatação**, em torno da molécula (ver Figura 2-7). O aumento da ordem das moléculas de água na camada de solvatação está correlacionado com uma redução desfavorável na entropia da água. Entretanto, quando grupos apolares se agrupam, o tamanho da camada de solvatação diminui, uma vez que cada grupo não expõe mais toda a sua superfície para a solução. O resultado é um aumento favorável de entropia. Como descrito no Capítulo 2, esse aumento de entropia é a principal força termodinâmica responsável pela associação de grupos hidrofóbicos em solução aquosa. Cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos tendem a se agrupar escondidas no interior das proteínas, longe da água (pense em uma gota de óleo na água). A sequência de aminoácidos da maioria das proteínas apresenta um conteúdo significativo de cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos (principalmente Leu, Ile, Val, Phe e Trp). Essas cadeias laterais se posicionam de forma a se aglomerar quando a proteína é enovelada, formando um núcleo hidrofóbico na proteína.

Sob condições fisiológicas, a formação de ligações de hidrogênio em uma proteína é, em grande parte, dirigida pelo mesmo efeito entrópico. Grupos polares normalmente podem formar ligações de hidrogênio com a água, e, por isso, são solúveis em água. Entretanto, o número de ligações de hidrogênio por unidade de massa normalmente é maior para a água pura do que para qualquer outro líquido ou solução, e há limites de solubilidade até para as moléculas

las mais polares, pois sua presença causa diminuição no número total de ligações de hidrogênio por unidade de massa. Portanto, uma camada de solvatação, até certo ponto, também se forma em torno de moléculas polares. Apesar de a energia de formação de uma ligação de hidrogênio intramolecular entre dois grupos polares em uma macromolécula ser em grande parte anulada pela eliminação de tais interações entre esses grupos polares e a água, a liberação da água estruturada, na forma de interações intramoleculares, garante a força entrópica que leva ao enovelamento. A maior parte da variação de energia livre proporcionada por interações fracas entre cadeias laterais de aminoácidos apolares dentro da proteína origina-se do aumento de entropia na solução aquosa circundante, portanto, é resultado do confinamento das superfícies hidrofóbicas o mais afastado da água. Isso mais do que contrabalança a grande perda de entropia conformacional, pois o polipeptídeo é limitado à sua conformação enovelada.

As interações hidrofóbicas são importantes na estabilização da conformação: o interior de uma proteína geralmente é um núcleo altamente compacto de cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos. Também é importante que cada grupo polar ou carregado que esteja no interior da proteína tenha um par adequado para fazer ligação de hidrogênio ou interação iônica. Pode parecer que uma ligação de hidrogênio contribua pouco para a estabilidade de uma estrutura nativa, mas a presença de grupos que podem fazer ligações de hidrogênio, mas estão sem um parceiro no núcleo hidrofóbico de uma proteína, pode ser tão *desestabilizadora* que conformações contendo esse grupo são termodinamicamente insustentáveis. A variação favorável de energia livre resultante da combinação de vários desses grupos com parceiros na solução que os circunda pode ser maior do que a diferença de energia livre entre os estados dobrados e não dobrados. Além disso, ligações de hidrogênio entre grupos de uma proteína se formam cooperativamente (a formação de uma torna mais provável a formação da próxima) em estruturas secundárias repetidas, o que faz as ligações de hidrogênio serem otimizadas, como descrito a seguir. Dessa forma, as ligações de hidrogênio normalmente têm um papel importante na condução do processo de enovelamento de proteínas.

A interação entre grupos carregados com cargas opostas, que formam um par iônico ou uma ponte salina, pode exercer tanto um efeito estabilizante quanto desestabilizante na estrutura da proteína. Como no caso das ligações de hidrogênio, cadeias laterais de aminoácidos carregados interagem com a água e com sais quando a proteína não está enovelada, e a perda dessas interações deve ser considerada quando se avalia o efeito das pontes salinas na estabilidade geral de uma proteína dobrada. Entretanto, a intensidade de uma ponte salina aumenta à medida que se passa para um ambiente com constante dielétrica, ϵ , mais baixa (p. 50): do solvente aquoso polar (ϵ próximo a 80) para o interior apolar da proteína (ϵ próximo a 4). Pontes salinas, principalmente aquelas parcial ou totalmente internas na proteína, podem, assim, proporcionar uma estabilização significativa da estrutura de uma proteína. Essa tendência explica a grande ocorrência de pontes salinas internas nas proteínas de organismos termofílicos. Interações iônicas também limitam a flexibilidade estrutural e conferem uma singularidade

a uma determinada estrutura proteica que interações hidrofóbicas não específicas não conseguem proporcionar.

No ambiente atômico altamente compacto de uma proteína, um outro tipo de interação fraca também pode ter um efeito significativo – interações de van der Waals (p. 53). As interações de van der Waals são interações dipolo-dipolo envolvendo os dipolos elétricos permanentes de grupos, como carbonilas, dipolos transitórios derivados das flutuações das nuvens de elétrons em torno de qualquer átomo e dipolos induzidos pela interação de um átomo com outro que contém um dipolo permanente ou transitório. À medida que os átomos interagem um com o outro, as interações dipolo-dipolo fornecem uma força intermolecular atrativa que opera apenas a uma distância intermolecular limitada (0,3 a 0,6 nm). As interações de van der Waals são fracas e individualmente contribuem pouco para a estabilidade geral da proteína. No entanto, em uma proteína bem empacotada ou na interação de uma proteína com outra proteína ou com outra molécula com uma superfície complementar, o número dessas interações pode ser substancial.

A maioria dos padrões estruturais reapresentados neste capítulo é o reflexo de duas regras simples: (1) resíduos hidrofóbicos estão basicamente escondidos no interior da proteína, longe da água, e (2) o número de ligações de hidrogênio dentro da proteína é maximizado, reduzindo, assim, o número de grupos capazes de fazer ligações de hidrogênio e de grupos iônicos que não estão adequadamente pareados. As proteínas de membrana (examinadas no Capítulo 11) e as proteínas que são intrinsecamente desordenadas ou que têm segmentos intrinsecamente desordenados seguem regras diferentes. Isso reflete as suas funções específicas ou ambientes específicos. De todo modo, as interações fracas ainda são elementos estruturais importantes. Por exemplo, proteínas solúveis, mas com segmentos intrinsecamente desordenados, são ricas em cadeias laterais de aminoácidos carregados (principalmente Arg, Lys e Glu) ou pequenos (Gly e Ala), gerando pouca ou nenhuma oportunidade para que se forme um núcleo hidrofóbico estável.

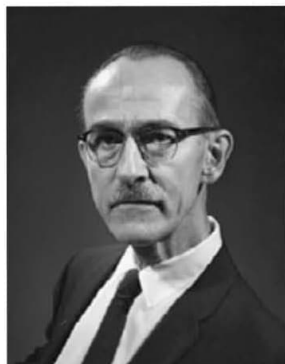
A ligação peptídica é rígida e planar

As ligações covalentes também impõem restrições importantes na conformação de um polipeptídeo. No fim de 1930, Linus Pauling e Robert Corey iniciaram uma série de estudos que lançaram os fundamentos do conhecimento atual sobre a estrutura das proteínas. Eles começaram com uma cuidadosa análise da ligação peptídica.

Os carbonos α de resíduos de aminoácidos adjacentes estão separados por três ligações covalentes, organizadas da seguinte maneira: $C_\alpha - C - N - C_\alpha$. Estudos de difração de raios X de cristais de aminoácidos e de dipeptídeos e tripeptídeos simples mostraram que a ligação peptídica $C - N$ é um pouco mais curta que a ligação $C - N$ de uma amina simples, e que os átomos associados à ligação peptídica são coplanares. Isso é um indicativo da ressonância ou o compartilhamento parcial de dois pares de elétrons entre o oxigênio carbonílico e o nitrogênio da amida (**Figura 4-2a**). O oxigênio tem uma carga parcial negativa e o hidrogênio ligado ao nitrogênio tem uma carga líquida parcial positiva, formando um pequeno dipolo elétrico. Os seis átomos do **grupo peptídico** estão em um único plano, com o átomo de oxigênio



Linus Pauling, 1901-1994
[Fonte: Nancy R. Schiff/Getty Images.]



Robert Corey, 1897-1971
[Fonte: cortesia do California Institute of Technology Archives.]

do grupo carbonílico *trans* em relação ao átomo de hidrogênio do nitrogênio da amida. A partir dessas observações, Pauling e Corey concluíram que as ligações peptídicas C—N não podem girar livremente, devido ao seu caráter de ligação dupla parcial. Por outro lado, a rotação entre a ligação

N—C_α e a ligação C_α—C é permitida. O esqueleto de uma cadeia polipeptídica pode, então, ser descrito como uma série de planos rígidos, com planos consecutivos compartilhando um ponto comum de rotação no C_α (Figura 4-2b). As ligações peptídicas rígidas limitam a variação de conformações possíveis que uma cadeia polipeptídica pode ter.

A conformação peptídica é definida por três ângulos diedros (também conhecidos como ângulos de torção), denominados ângulos ϕ (phi), ψ (psi) e ω (omega), que refletem a rotação ao redor de cada uma das três ligações que se repetem no esqueleto do peptídeo. Ângulo diedro é o ângulo da intersecção de dois planos. No caso dos peptídeos, os planos são definidos pelos vetores das ligações do esqueleto peptídico. Dois vetores de ligações sucessivas descrevem um plano. Três vetores de ligações sucessivas descrevem dois planos (o vetor da ligação central é comum a ambos; Figura 4-2c), e o ângulo entre esses dois planos é o que se mede para descrever a conformação da proteína.

» **Convenção-chave:** os ângulos diedros importantes para um peptídeo são definidos pelos três vetores das ligações que conectam quatro átomos consecutivos da cadeia principal (esqueleto peptídico) (Figura 4-2c): ϕ envolve as ligações

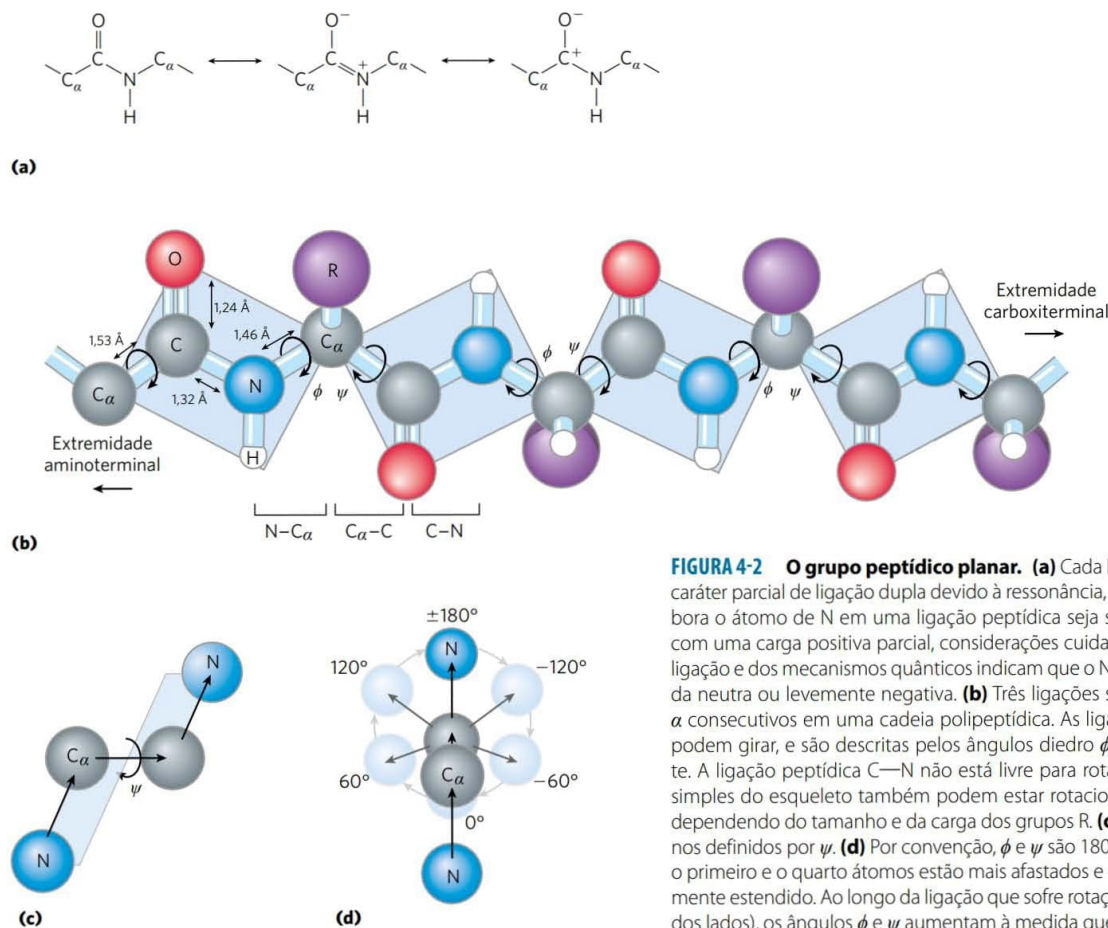


FIGURA 4-2 O grupo peptídico planar. (a) Cada ligação peptídica tem caráter parcial de ligação dupla devido à ressonância, e não pode girar. Embora o átomo de N em uma ligação peptídica seja sempre representado com uma carga positiva parcial, considerações cuidadosas dos orbitais de ligação e dos mecanismos quânticos indicam que o N tem uma carga líquida neutra ou levemente negativa. (b) Três ligações separam os carbonos α consecutivos em uma cadeia polipeptídica. As ligações N—C_α e C_α—C podem girar, e são descritas pelos ângulos diedro ϕ e ψ , respectivamente. A ligação peptídica C—N não está livre para rotação. Outras ligações simples do esqueleto também podem estar rotacionalmente obstruídas, dependendo do tamanho e da carga dos grupos R. (c) Os átomos e os planos definidos por ψ . (d) Por convenção, ϕ e ψ são 180° (ou -180°) quando o primeiro e o quarto átomos estão mais afastados e o peptídeo está totalmente estendido. Ao longo da ligação que sofre rotação (para qualquer um dos lados), os ângulos ϕ e ψ aumentam à medida que o quarto átomo gira no sentido horário em relação ao primeiro átomo. Algumas conformações mostradas aqui (p. ex., 0°) são proibidas em uma proteína, devido à sobreposição espacial de átomos. De (b) até (d), as esferas que representam os átomos são menores do que os raios de van der Waals para esta escala.

$C-N-C_\alpha-C$ (com a rotação ocorrendo na ligação $N-C_\alpha$) e ψ envolve as ligações $N-C_\alpha-C-N$. Tanto ϕ como ψ são definidos como $\pm 180^\circ$ quando o polipeptídeo está totalmente estendido e todos os grupos peptídicos estão no mesmo plano (Figura 4-2d). Quando se observa ao longo do vetor da ligação central, na direção da flecha do vetor (como mostrado na Figura 4-2c para ψ), os ângulos diedros aumentam à medida que o átomo distal (quarto átomo) gira no sentido horário (Figura 4-2d). A partir da posição $\pm 180^\circ$, o ângulo diedro aumenta de -180° para 0° , ponto no qual o primeiro e quarto átomos estão eclipsados. A rotação pode continuar de 0° para $+180^\circ$ (mesma posição que -180°) e trazer a estrutura de volta para o ponto de partida. O terceiro ângulo diedro, ω geralmente não é considerado. Ele envolve as ligações $C_\alpha-C-N-C_\alpha$. A ligação central nesse caso é a ligação peptídica, cuja rotação é restrita. A ligação peptídica quase sempre (99,6% do tempo) tem configuração *trans*, limitando ω a um valor de $\pm 180^\circ$. No caso raro de uma ligação peptídica *cis*, $\omega = 0^\circ$. <<

Em princípio, ϕ e ψ podem ter qualquer valor entre -180° e $+180^\circ$. Entretanto, muitos valores são proibidos devido à interferência estérica entre átomos do esqueleto da cadeia polipeptídica e átomos das cadeias laterais dos resí-

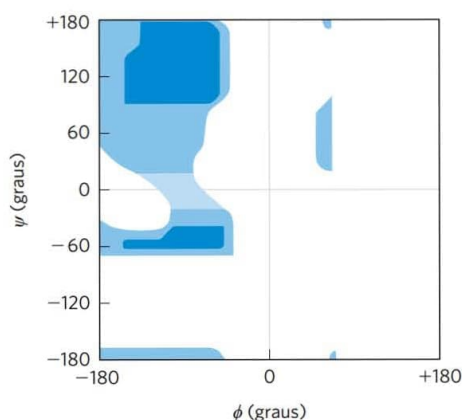


FIGURA 4-3 Diagrama de Ramachandran para resíduos L-Ala. As conformações dos peptídeos são definidas pelos valores de ϕ e ψ . Conformações consideradas possíveis são aquelas que envolvem pouco ou nenhum impedimento estérico, com base nos cálculos dos raios de van der Waals conhecidos e dos ângulos diedros. As áreas sombreadas em azul-escuro mostram conformações que envolvem ausência de sobreposição espacial se os raios de van der Waals de cada átomo são modelados como uma esfera rígida e, portanto, são totalmente permitidas. Azul-claro indica conformações permitidas caso os átomos possam se aproximar um do outro por uma distância adicional de de 0,1 nm, um pequeno choque entre os átomos. O azul mais claro indica conformações que são permitidas apenas se for aceita uma flexibilidade muito modesta (poucos graus) no ângulo diedro ω que descreve a própria ligação peptídica (geralmente restrito a 180°). As regiões em branco são conformações não permitidas. A assimetria do diagrama é resultante da estereoquímica L dos resíduos de aminoácidos. Os diagramas para outros resíduos L com cadeias laterais não ramificadas são quase idênticos. Os limites permitidos para resíduos ramificados, como Val, Ile e Thr, são um pouco menores do que para Ala. O resíduo Gly, que é estericamente menos impedido, apresenta um limite bem mais amplo de conformações permitidas. A faixa para os resíduos de Pro é grandemente restrita, uma vez que ϕ está limitado pela cadeia lateral cíclica a uma faixa entre -35° e -85° . [Fonte: informações de T. E. Creighton, *Proteins*, p. 166. © 1984 por W. H. Freeman and Company. Uso autorizado.]

duos de aminoácidos. A conformação na qual tanto ϕ quanto ψ são 0° (Figura 4-2d) é proibida devido a esse motivo. Essa conformação é meramente uma referência para descrever os ângulos diedros. As preferências dos ângulos do esqueleto do polipeptídeo adicionam ainda uma outra restrição à estrutura enovelada de uma proteína. Os valores permitidos para ϕ e ψ tornam-se evidentes quando ψ são plotados contra ϕ no **diagrama de Ramachandran (Figura 4-3)**, proposto por G. N. Ramachandran. Será visto que os gráficos de Ramachandran são muito úteis. Em geral, eles são usados para testar a qualidade das estruturas tridimensionais de proteínas que são depositadas em bancos de dados internacionais.

RESUMO 4.1 Visão geral sobre a estrutura das proteínas

- Uma proteína típica geralmente tem uma ou mais estruturas tridimensionais, ou conformações que refletem a sua função. Algumas proteínas têm segmentos intrinsecamente desordenados.
- A estrutura da proteína é estabilizada, em grande parte, por múltiplas interações fracas. O efeito hidrofóbico, derivado do aumento da entropia da água circundante quando moléculas ou grupos apolares estão agrupados, traz a principal contribuição para a estabilização da forma globular da maioria das proteínas solúveis; as interações de van der Waals também contribuem. Nas estruturas termodinamicamente mais estáveis, as ligações de hidrogênio e as interações iônicas estão otimizadas.
- Ligações covalentes não peptídicas, sobretudo ligações dissulfeto, são importantes na estabilização da estrutura de algumas proteínas.
- A natureza das ligações covalentes no esqueleto polipeptídico traz restrições quanto à estrutura que pode ocorrer. A ligação peptídica tem um caráter parcial de ligação dupla, que mantém todo o grupo peptídico de seis átomos em uma configuração planar rígida. As ligações $N-C_\alpha$ e $C_\alpha-C$ podem girar e definem os ângulos diedro ϕ e ψ , respectivamente, embora os valores permitidos para os ângulos ϕ e ψ também sejam limitados por impedimentos estéricos, entre outros.
- O gráfico de Ramachandran é uma descrição visual dos ângulos diedro ϕ e ψ que são permitidos e não permitidos em um esqueleto peptídico devido a impedimentos estéreos.

4.2 Estrutura secundária das proteínas

O termo **estrutura secundária** refere-se a qualquer segmento de uma cadeia polipeptídica e descreve o arranjo espacial dos átomos na cadeia principal, sem considerar a posição das cadeias laterais ou a relação com outros segmentos. Ocorre uma estrutura secundária *regular* quando cada ângulo diedro, ϕ e ψ , permanece o mesmo por todo o segmento. Existem alguns tipos de estruturas secundárias que são particularmente estáveis e ocorrem extensamente em proteínas. As mais conhecidas são as α -hélices e as conformações β ; outro tipo comum é a curva β . Quando um padrão regular não é observado, algumas vezes a estrutura secundária é chamada de indefinida ou espiral aleatória. Esta última, entretanto, não descreve adequadamente a es-

estrutura desses segmentos. O curso da maioria dos esqueletos polipeptídicos em uma proteína típica não é aleatório; ele é invariável e é altamente específico para a estrutura e a função de uma determinada proteína. A discussão tem as estruturas mais comuns como foco.

A α -hélice é uma estrutura secundária das proteínas muito comum

Pauling e Corey estavam cientes da importância das ligações de hidrogênio na orientação de grupos polares, como os grupos C=O e N—H, para a ligação peptídica. Também conheciam os resultados experimentais de William Astbury, que, em 1930, realizou estudos pioneiros de proteínas utilizando raios X. Astbury demonstrou que proteínas que formam os cabelos e os espinhos do porco-espinho (a proteína fibrosa α -queratina) têm uma estrutura regular que se repete a cada 5,15 a 5,2 Å. (O ångström, Å, em homenagem ao físico Anders J. Ångström, é igual a 0,1 nm. Apesar de não ser uma unidade do SI, ela é universalmente utilizada pelos biólogos estruturais para descrever as distâncias atômicas — é aproximadamente o tamanho de uma ligação C—H comum.) Com essa informação e os dados que obtiveram sobre a ligação peptídica e a ajuda de modelos construídos de forma precisa, Pauling e Corey iniciaram determinando as conformações prováveis das moléculas das proteínas.

O primeiro avanço ocorreu em 1948. Pauling foi professor visitante na Universidade de Oxford, ficou doente e se

recolheu a seu apartamento por alguns dias para descansar. Entediado com o que tinha disponível para ler, Pauling pegou papel e lápis e começou a pensar em uma estrutura estável plausível que poderia ser adotada por uma cadeia polipeptídica. O modelo que ele desenvolveu, confirmado mais tarde no trabalho com Corey e o colaborador Herman Branson, foi o arranjo mais simples que a cadeia polipeptídica pode assumir que maximiza o uso de ligações de hidrogênio internas. Essa é uma estrutura em hélice, e Pauling e Corey a chamaram de α -hélice (Figura 4-4). Nessa estrutura, o esqueleto polipeptídico é firmemente enrolado em torno de um eixo imaginado longitudinalmente no centro da hélice, e os grupos R dos resíduos de aminoácidos se projetam para fora do esqueleto helicoidal. A unidade que se repete forma uma volta de hélice, que se estende por cerca de 5,4 Å ao longo do eixo, levemente maior do que a periodicidade observada por Astbury na análise por raios X da queratina do cabelo. Os átomos do esqueleto dos resíduos de aminoácidos em uma α -hélice típica têm um grupo característico de ângulos diedros que definem a conformação da α -hélice (Tabela 4-1), e cada volta de hélice é formada por 3,6 resíduos de aminoácidos. Normalmente, os segmentos de α -hélice em proteínas se desviam um pouco desses ângulos diedros, podendo até variar dentro de um mesmo segmento, gerando curvaturas ou torções do eixo da hélice. Pauling e Corey consideraram as variantes da α -hélice voltadas tanto para a direita quanto para a esquerda. A subsequente elucidação da estrutura tridimensional da α -hélice da mioglobina

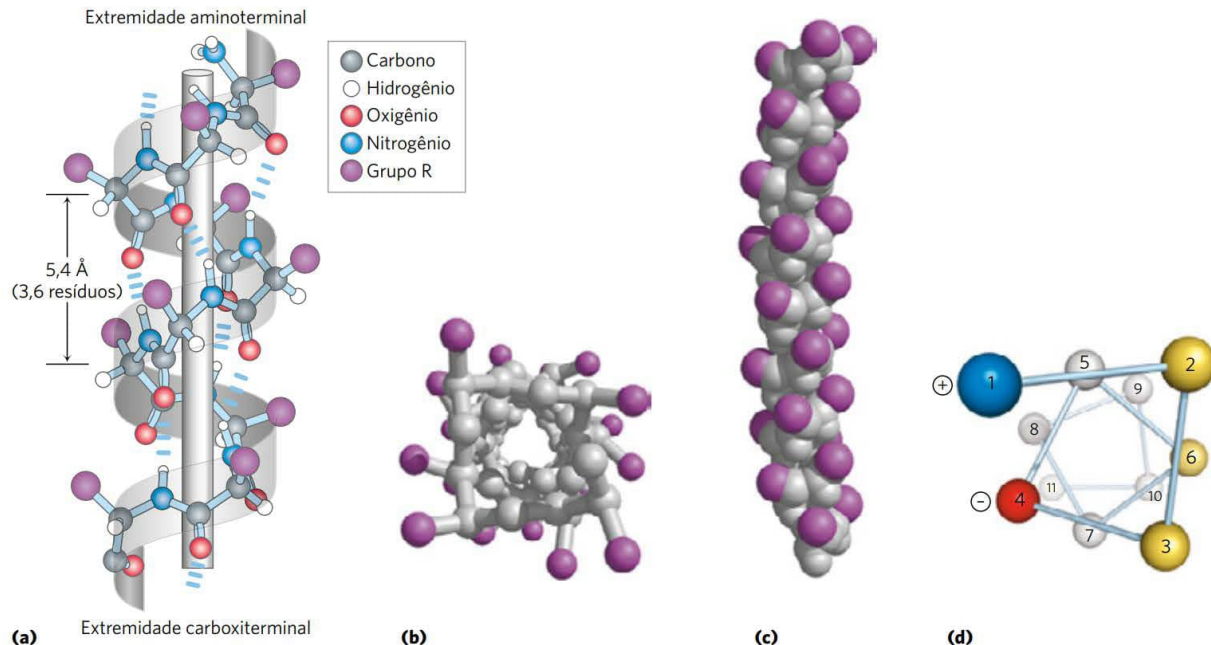


FIGURA 4-4 Modelos de α -hélice mostrando os diferentes aspectos da sua estrutura. (a) Modelo de esfera e bastão mostrando as ligações de hidrogênio internas da cadeia. A unidade que se repete é uma volta da hélice: 3,6 resíduos. (b) α -hélice vista de uma de suas extremidades, ao longo do eixo central (obtida a partir do PDB ID 4TNC). Observe as posições dos grupos R, representados pelas esferas roxas. Esse modelo de esfera e bastão, que ressalta o arranjo helicoidal, dá uma falsa impressão de que a hélice é oca, pois as esferas não mostram individualmente os raios de van der Waals dos átomos. (c) Como este modelo de volume atômico mostra, os átomos no centro da α -hélice estão em contato estreito. (d) Projeção da rotação helicoidal de uma α -hélice. Esta representação foi colorida para identificar melhor as superfícies com determinadas propriedades. Os resíduos em amarelo, por exemplo, podem ser hidrofóbicos e fazer parte de uma interface entre a hélice mostrada aqui e outra parte do mesmo ou de outro polipeptídeo. Os resíduos vermelho (negativo) e azul (positivo) ilustram o potencial de interação de cadeias laterais de cargas opostas, separadas por dois resíduos na hélice. [Fonte: (b, c) obtida de PDB ID 4TNC, K. A. Satyshur et al., *J. Biol. Chem.* 263:1628, 1988.]

TABELA 4-1 Ângulos ϕ e ψ ideais para estruturas secundárias comuns em proteínas

Estrutura	ϕ	ψ
α -Hélice	-57°	-47°
Conformação β		
Antiparalela	-139°	$+135^\circ$
Paralela	-119°	$+113^\circ$
Tripla hélice de colágeno	-51°	$+153^\circ$
Curva β tipo I		
$i + 1^a$	-60°	-30°
$i + 2^a$	-90°	0°
Curva β tipo II		
$i + 1$	-60°	$+120^\circ$
$i + 2$	$+80^\circ$	0°

Nota: nas proteínas reais, os ângulos diedros frequentemente são um pouco diferentes desses valores ideais.

^aOs ângulos $i + 1$ e $i + 2$ são aqueles para o segundo e terceiro resíduos de aminoácidos na curva β , respectivamente.

e de outras proteínas mostrou que a α -hélice voltada para a direita é a forma comum (Quadro 4-1). α -Hélices estendidas voltadas para a esquerda são teoricamente menos estáveis e não foram observadas em proteínas. A α -hélice é a estrutura predominante nas α -queratinas. De forma geral, cerca de um quarto de todos os resíduos de aminoácidos das proteínas é encontrado em α -hélices. O resto varia muito de proteína para proteína.

Por que as α -hélices se formam mais facilmente do que qualquer outra das possíveis conformações? A resposta encontra-se, em parte, no uso otimizado das ligações de hidrogênio internas. A estrutura é estabilizada por uma ligação de hidrogênio entre o átomo de hidrogênio ligado ao átomo de nitrogênio eletronegativo de uma ligação peptídica e o átomo de oxigênio eletronegativo da carbonila do quarto aminoácido no lado aminoterminal da ligação peptídica (Figura

4-4a). Na α -hélice, cada ligação peptídica (exceto aquelas próximas às extremidades da α -hélice) participa dessas ligações de hidrogênio. Cada volta sucessiva da α -hélice está ligada a voltas adjacentes por três ou quatro ligações de hidrogênio, conferindo uma estabilidade significativa para a estrutura como um todo. Nas extremidades de um segmento α -helicoidal, sempre há três ou quatro grupos carbonila ou amino que não podem participar desse padrão helicoidal de ligações de hidrogênio. Eles podem estar expostos ao solvente circundante, onde as ligações de hidrogênio que fazem com a água ou com outras partes da proteína podem proteger a hélice e proporcionar os parceiros necessários para formar ligações de hidrogênio.

Outros experimentos mostraram que uma α -hélice pode ser formada em polipeptídeos constituídos de aminoácidos L ou D. Entretanto, todos os resíduos devem ser de um mesmo estereoisômero; um D-aminoácido romperá a estrutura regular formada por L-aminoácidos, e vice-versa. A forma mais estável de uma α -hélice de D-aminoácidos é a voltada para a esquerda.

PROBLEMA 4-1 Estrutura secundária e dimensões de uma proteína

Qual é o comprimento de uma cadeia polipeptídica de 80 resíduos de aminoácidos em uma única α -hélice?

Solução: uma α -hélice ideal tem 3,6 resíduos por volta, e o avanço ao longo do eixo helicoidal é de 5,4 Å. Portanto, o avanço sobre o eixo, para cada resíduo de aminoácido, é de 1,5 Å. O comprimento do peptídeo é, portanto, 80 resíduos \times 1,5 Å/resíduo = 120 Å.

A sequência de aminoácidos afeta a estabilidade da α -hélice

Nem todos os polipeptídeos podem formar uma α -hélice estável. Cada resíduo de aminoácido em um polipeptídeo tem uma propensão intrínseca para formar uma α -hélice (Tabela 4-2), consequência das propriedades dos grupos R e

QUADRO 4-1 MÉTODOS Distinção entre giro para a direita e giro para a esquerda

Existe um método simples para determinar se uma estrutura helicoidal gira para a direita ou para a esquerda. Basta fazer uma associação com as duas mãos, com os polegares esticados, apontando para longe. Olhando para a sua mão direita, pense em uma hélice se enrolando ao longo do polegar direito, na direção dos outros dedos, dobrados conforme mostrado na figura (sentido horário). A hélice resultante gira para a direita. A mão esquerda representará uma hélice que gira para a esquerda no sentido anti-horário à medida que se enrola ao redor do polegar.



TABELA 4-2 Tendência dos resíduos de aminoácidos em assumir a conformação de α -hélice

Aminoácido	$\Delta\Delta G^\circ$ (kJ/mol) ^a	Aminoácido	$\Delta\Delta G^\circ$ (kJ/mol) ^a
Ala	0	Leu	0,79
Arg	0,3	Lys	0,63
Asn	3	Met	0,88
Asp	2,5	Phe	2,0
Cys	3	Pro	> 4
Gln	1,3	Ser	2,2
Glu	1,4	Thr	2,4
Gly	4,6	Tyr	2,0
His	2,6	Trp	2,0
Ile	1,4	Val	2,1

Fontes: dados (exceto para prolina) obtidos de J. W. Bryson et al., *Science* 270:935, 1995. Dados para prolina obtidos de J. K. Myers et al., *Biochemistry* 36:10,923, 1997.

^a $\Delta\Delta G^\circ$ é a diferença de variação de energia livre, relativa àquela para a alanina, necessária para que os resíduos de aminoácidos assumam a conformação em α -hélice. Valores maiores refletem uma grande dificuldade para assumir a conformação em α -hélice. O conjunto de dados é derivado de muitos experimentos e sistemas experimentais.

de como essas propriedades interferem na capacidade dos átomos que formam a cadeia principal de aceitar os ângulos ϕ e ψ característicos. A alanina apresenta a melhor tendência em formar α -hélices na maioria dos sistemas-modelo experimentais.

A posição de um resíduo de aminoácido em relação a seus vizinhos também é importante. Interações entre cadeias laterais dos aminoácidos podem estabilizar ou desestabilizar a estrutura α -helicoidal. Por exemplo, se uma cadeia polipeptídica possui uma longa sequência de resíduos Glu, esse segmento da cadeia não formará uma α -hélice em pH 7,0. Os grupos carboxílicos, carregados negativamente, dos resíduos Glu adjacentes repelem-se mutuamente de forma tão forte que impedem a formação da α -hélice. Pela mesma razão, se existem muitos resíduos Lys e/ou Arg, com grupos R carregados positivamente em pH 7,0, eles também se repelem, impedindo a formação da α -hélice. O volume e a forma dos resíduos Asn, Ser, Thr e Cys também podem desestabilizar uma α -hélice se estiverem muito próximos na cadeia.

A torção de uma hélice garante que ocorram interações cruciais entre a cadeia lateral de um aminoácido e a cadeia lateral do terceiro (às vezes quarto) resíduo adiante, para ambos os lados da hélice. Isso fica claro quando a α -hélice é representada como roda helicoidal (Figura 4-4d). Os aminoácidos carregados positivamente costumam ser encontrados a três resíduos de distância dos aminoácidos carregados negativamente, possibilitando a formação de pares iônicos. Dois aminoácidos aromáticos geralmente são espaçados de forma semelhante, resultando em uma interação hidrofóbica.

Uma restrição à formação da α -hélice é a presença de resíduos de Pro e Gly, que apresentam a menor propensão em formar α -hélices. Na prolina, o átomo de nitrogênio faz

parte de um anel rígido (ver Figura 4-8), e assim não há possibilidade que a ligação N—C $_{\alpha}$ gire. Dessa forma, um resíduo Pro gera uma torção que desestabiliza a hélice. Além disso, o átomo de nitrogênio do resíduo Pro que participa de uma ligação peptídica não tem hidrogênio para participar em ligações com outros resíduos. Por essas razões, a prolina raramente é encontrada em uma α -hélice. A glicina geralmente não ocorre em α -hélices por outro motivo: ela tem maior flexibilidade conformacional do que os demais aminoácidos. Polímeros de glicina tendem a formar estruturas espiraladas bem diferentes de uma α -hélice.

Um último fator que afeta a estabilidade de uma α -hélice é a identidade dos resíduos de aminoácido próximos às extremidades do segmento α -helicoidal do polipeptídeo. Existe um pequeno dipolo elétrico em cada ligação peptídica (Figura 4-2a). Esses dipolos estão alinhados por meio das ligações de hidrogênio da hélice, resultando em um dipolo livre ao longo do eixo helicoidal que aumenta com o comprimento da hélice (Figura 4-5). As cargas parcialmente positivas e negativas do dipolo da hélice ocorrem nos grupos amino e carbonil próximos às extremidades amino e carboxiterminal, respectivamente. Por isso, os aminoácidos carregados negativamente costumam ser encontrados próximos à extremidade aminoterminal do segmento helicoidal, onde apresentam interações estabilizantes com a carga positiva do dipolo da hélice; um aminoácido positivamente carregado na extremidade aminoterminal desestabilizaria o sistema. O oposto é verdade para a extremidade carboxiterminal do segmento helicoidal.

Resumindo, cinco tipos de restrições influenciam a estabilidade de uma α -hélice: (1) a tendência intrínseca de um resíduo de aminoácido de formar α -hélice; (2) as interações entre os grupos R, principalmente aqueles espaçados por três (ou quatro) aminoácidos; (3) os volumes de grupos R adjacentes; (4) a ocorrência de resíduos Pro e Gly; e (5) as interações entre os resíduos de aminoácidos das extremi-

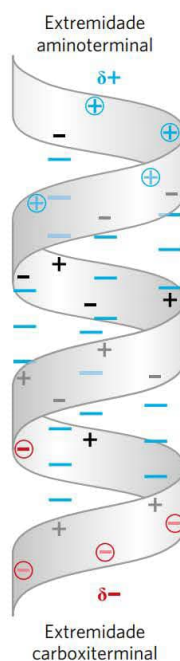


FIGURA 4-5 Dipolo da hélice. O dipolo elétrico da ligação peptídica (ver Figura 4-2a) é transmitido ao longo do segmento α -helicoidal pelas ligações de hidrogênio intracadeia, resultando em um dipolo da hélice. Nesta ilustração, os componentes amino e carbonila de cada ligação peptídica estão indicados com os símbolos + e -, respectivamente. Os componentes amino e carbonila das ligações peptídicas próximas às extremidades da região α -helicoidal que não participam de ligações de hidrogênio estão circundados e mostrados em cores.

dades do segmento helicoidal e o dipolo elétrico inerente da α -hélice. A tendência de um determinado segmento de uma cadeia polipeptídica de formar uma α -hélice depende, portanto, da identidade e da sequência de resíduos de aminoácidos do segmento.

As conformações β organizam as cadeias polipeptídicas em forma de folhas

Em 1951, Pauling e Corey reconheceram um segundo tipo de estrutura recorrente, a **conformação β** . Essa é uma conformação mais estendida das cadeias polipeptídicas, e sua estrutura é de novo definida pelos esqueletos dos átomos arranjados de acordo com um grupo característico dos ângulos diedro (Tabela 4-1). Na conformação β , o esqueleto da cadeia polipeptídica está estendido em forma de zigue-zague, em vez de em estrutura helicoidal (**Figura 4-6**). O arranjo de vários segmentos lado a lado, os quais estão na conformação β , é chamado de **folha β** . A estrutura em zigue-zague dos segmentos polipeptídicos individuais dá origem a uma aparência pregueada das folhas em geral. As ligações de hidrogênio são formadas entre segmentos ad-

acentes da cadeia polipeptídica, dentro da folha. Os segmentos que formam a folha β normalmente estão próximos na cadeia polipeptídica, mas também podem estar bem distantes uns dos outros na sequência linear do polipeptídeo; eles podem até estar em cadeias polipeptídicas diferentes. Os grupos R dos aminoácidos adjacentes se projetam da estrutura em zigue-zague em direções opostas, criando um padrão alternado que pode ser observado na visão lateral da Figura 4-6.

As cadeias polipeptídicas adjacentes em uma folha β podem ser tanto paralelas quanto antiparalelas (apresentando uma orientação amino para carboxiterminal igual ou oposta, respectivamente). As estruturas são, de alguma forma, semelhantes, apesar de o período de repetição ser menor na conformação paralela (6,5 Å, contra 7 Å para a antiparalela) e o padrão das ligações de hidrogênio ser diferente. As ligações de hidrogênio intersegmentos são alinhadas (ver Figura 2-5) na folha β antiparalela, ao passo que elas são distorcidas ou não alinhadas na variante paralela. As estruturas ideais exibem os ângulos de ligação dados na Tabela 4-1; esses valores variam um pouco nas proteínas verdadeiras, resultando em uma variação estrutural, conforme visto anteriormente para as α -hélices.

Curvas β são comuns em proteínas

Em proteínas globulares, que apresentam estrutura enovelada compacta, alguns resíduos de aminoácidos estão em voltas ou alças onde a cadeia polipeptídica inverte a direção (**Figura 4-7**). Esses são elementos conectores que ligam estruturas sucessivas de α -hélices e conformações β . As **curvas β** são particularmente comuns e conectam as extremidades de dois segmentos adjacentes de uma folha β antiparalela. A estrutura é uma volta de 180° que envolve quatro resíduos de aminoácidos, com o oxigênio carbonílico do primeiro resíduo formando uma ligação de hidrogênio com o hidrogênio do grupo amino do quarto resíduo. Os grupos peptídicos dos dois resíduos centrais não participam de nenhuma ligação de hidrogênio inter-resíduos. Vários tipos de curvas β têm sido descritos, cada um definido pelos ângulos ϕ e ψ das ligações que ligam os quatro resíduos de aminoácidos que formam uma dessas curvas em particular (Tabela 4-1). Os resíduos Gly e Pro frequentemente ocorrem em curvas β ; o primeiro porque é pequeno e flexível, e o último porque as ligações peptídicas envolvendo o nitrogênio imino da prolina facilmente assumem configuração *cis* (**Figura 4-8**), forma particularmente acessível em uma curva fechada. Os dois tipos mais comuns de curvas β estão mostrados na Figura 4-7. As curvas normalmente são encontradas próximas à superfície das proteínas, onde os grupos peptídicos dos dois resíduos de aminoácidos centrais da alça podem fazer ligação de hidrogênio com a água. Muito menos comum é a curva γ , uma volta com três resíduos e ligação de hidrogênio entre o primeiro e o terceiro resíduos.

Estruturas secundárias comuns têm ângulos diedros característicos

As α -hélices e as conformações β são as principais estruturas secundárias que se repetem em um grande número de proteínas, apesar de existirem outras estruturas que se

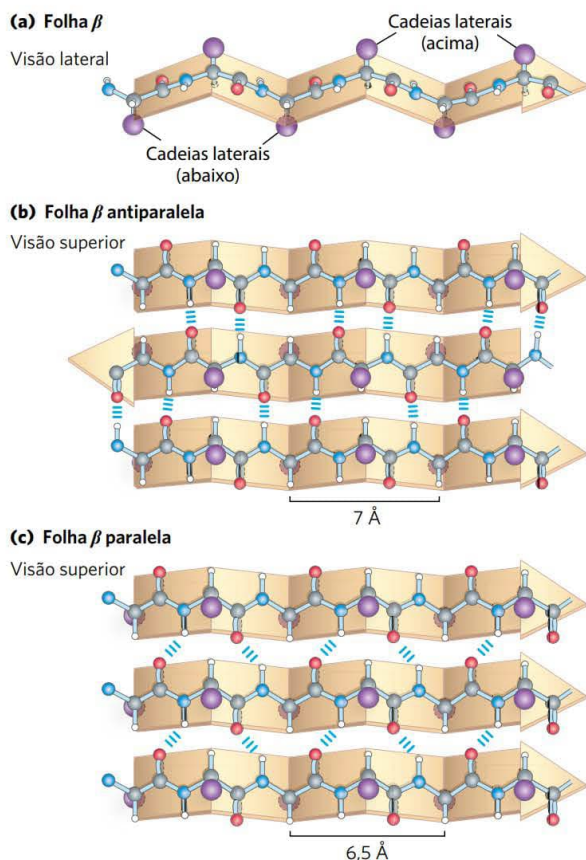


FIGURA 4-6 A conformação β das cadeias polipeptídicas. Estas visões (a) lateral e (b, c) superior mostram os grupos R saindo do plano da folha β e enfatizam a forma pregueada formada pelos planos das ligações peptídicas. (Um nome alternativo para esta estrutura é folha pregueada β .) As ligações de hidrogênio entre as cadeias adjacentes também estão mostradas. A orientação das cadeias adjacentes (setas), do aminoterminoal para carboxiterminal, pode ser a mesma ou oposta, formando (b) folhas β paralelas ou (c) folhas β antiparalelas.

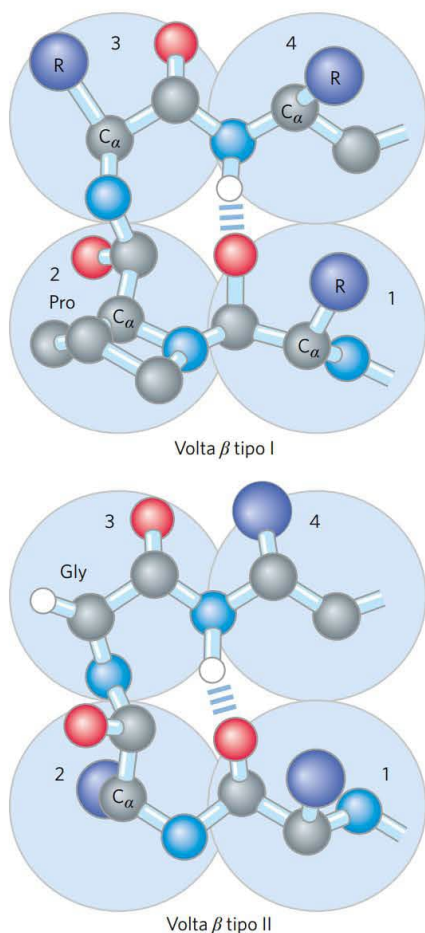


FIGURA 4-7 Estruturas de curvas β . Curvas β dos tipos I e II são as mais comuns. Distinguem-se pelos ângulos ϕ e ψ adotados pelo esqueleto peptídico na curva (ver Tabela 4-1). As curvas do tipo I ocorrem com frequência duas vezes mais do que as curvas do tipo II. Apesar de muitos resíduos de aminoácidos poderem se acomodar nessas curvas, alguns vieses ficam evidentes. Prolina é o resíduo de aminoácido mais comum nas curvas tipo I, aparecendo em 16% dos casos. Pro também é o resíduo mais comum na posição 2 no tipo II, aparecendo cerca de 23% das vezes. O viés mais evidente é a presença de Gly na posição 3 em mais de 75% das curvas do tipo II. Observe a ligação de hidrogênio entre os grupos peptídicos do primeiro e do quarto resíduos das curvas. (Cada um dos resíduos de aminoácidos está identificado por grandes círculos azuis. Nem todos os átomos de H estão mostrados.)

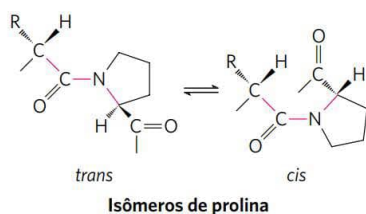


FIGURA 4-8 Isômeros *trans* e *cis* de uma ligação peptídica envolvendo o nitrogênio imino da prolina. Das ligações peptídicas entre resíduos de aminoácidos que não são Pro, mais de 99,95% estão na configuração *trans*. Para as ligações peptídicas envolvendo o nitrogênio imino da prolina, no entanto, cerca de 6% estão na configuração *cis*; muitas delas ocorrem em curvas β .

repetem em algumas proteínas especializadas (um exemplo é o colágeno; ver Figura 4-13). Cada tipo de estrutura secundária pode ser completamente descrito pelos ângulos diedros ϕ e ψ , associados a cada resíduo de aminoácido. Como mostrado no diagrama de Ramachandran, os ângulos diedros que definem a α -hélice e a conformação β se encontram em uma região restrita de estruturas estericamente permitidas (**Figura 4-9a**). A maioria dos valores de ϕ e ψ obtidos de estruturas de proteínas conhecidas cai nas regiões esperadas, com alta concentração perto dos valores preditos para as α -hélices e as conformações β (Figura 4-9b). O único resíduo de aminoácido normalmente encontrado fora dessas regiões é a glicina. Como a sua cadeia lateral é pequena, o resíduo Gly pode assumir diversas conformações estericamente proibidas para os demais aminoácidos.

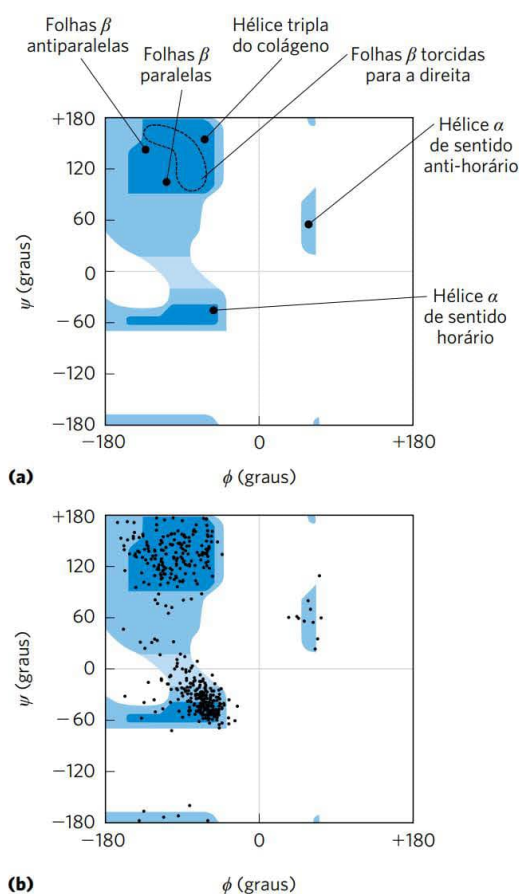


FIGURA 4-9 Diagrama de Ramachandran mostrando várias estruturas. (a) Os valores de ϕ e ψ para várias estruturas secundárias permitidas estão sobrepostos no gráfico da Figura 4-3. Apesar de as α -hélices de sentido anti-horário com vários resíduos de aminoácidos serem teoricamente permitidas, elas não foram observadas em proteínas. (b) Os valores de ϕ e ψ para todos os aminoácidos, exceto Gly, da enzima piruvato-cinase (isolada de coelho) estão sobrepostos no diagrama das conformações teoricamente permitidas (Figura 4-3). Os pequenos e flexíveis resíduos de Gly foram excluídos, pois, em geral, caem fora da região esperada (em azul). [Fontes: (a) informações de T. E. Creighton, *Proteins*, p. 166. © 1984 por W. H. Freeman and Company. (b) Cortesia de Hazel Holden, University of Wisconsin – Madison, Department of Biochemistry.]

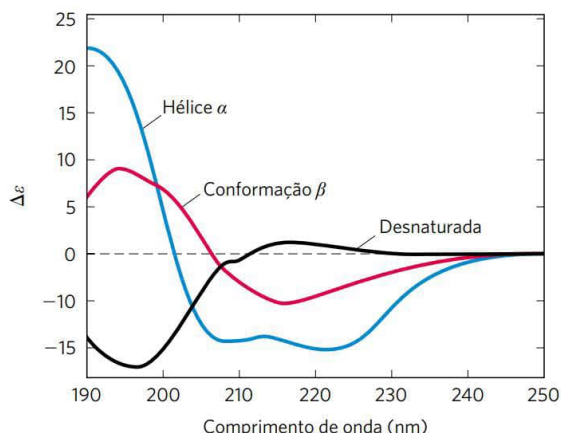


FIGURA 4-10 Espectroscopia de dicroísmo circular (CD). Este espectro mostra polilisina inteiramente como α -hélices, como conformação β ou em um estado não estruturado, desnatado. A unidade do eixo y é uma simplificação das unidades comumente utilizadas em experimentos de CD. Como as curvas são diferentes para as α -hélices, conformações β e a conformação desnatada, o espectro de CD fornece uma estimativa da fração da proteína que está nas duas estruturas secundárias mais comuns. O espectro de CD da proteína nativa pode servir como referência para o estado enovelado e é útil no monitoramento tanto da desnaturação como de mudanças conformacionais resultantes de alterações nas condições da solução.

As estruturas secundárias comuns podem ser identificadas por dicroísmo circular

Qualquer forma de assimetria estrutural em uma molécula leva a diferenças na absorção da luz circularmente polarizada para a esquerda em relação à para a direita. A medida dessa diferença é chamada de **espectroscopia de dicroísmo circular (CD)**, do inglês, *circular dichroism*). Uma estrutura ordenada, como a estrutura de uma proteína enovelada, dá um espectro de absorção que pode ter picos ou regiões com valores tanto positivos, quanto negativos. Para proteínas, os espectros são obtidos na região de UV distante (190 a 250 nm). A entidade que absorve luz, ou cromóforo, nessa região é a ligação peptídica; obtém-se um sinal quando esta ligação peptídica está em um ambiente enovelado. A diferença no coeficiente de extinção molar (ver Quadro 3-1) para a luz circularmente polarizada para a esquerda e para a direita ($\Delta\epsilon$) é colocada no gráfico em função do comprimento de onda. A α -hélice e as conformações β possuem espectros CD característicos (**Figura 4-10**). Com o espectro de CD, os bioquímicos podem determinar se as proteínas estão enoveladas corretamente, estimar a fração da proteína que assume qualquer uma das duas estruturas secundárias comuns e monitorar as transições entre os estados enovelados e não enovelados.

RESUMO 4.2 Estrutura secundária das proteínas

- Estrutura secundária é o arranjo espacial dos átomos da cadeia principal em um determinado segmento da cadeia polipeptídica.
- As estruturas secundárias mais comuns são a α -hélice, a conformação β e as curvas β .

- A estrutura secundária de um segmento polipeptídico pode ser completamente definida se os ângulos ϕ e ψ de todos os aminoácidos do segmento forem conhecidos.
- A espectroscopia de dicroísmo circular é um método para identificar as estruturas secundárias comuns e o monitoramento do enovelamento das proteínas.

4.3 Estruturas terciária e quaternária das proteínas

O arranjo tridimensional total de todos os átomos de uma proteína é chamado de **estrutura terciária**. Enquanto o termo “estrutura secundária” se refere ao arranjo espacial dos resíduos de aminoácidos adjacentes em um segmento polipeptídico, a estrutura terciária inclui aspectos de *longo alcance* da sequência de aminoácidos. Aminoácidos que estão bem distantes na sequência polipeptídica e em diferentes tipos de estruturas secundárias podem interagir na estrutura da proteína completamente enovelada. A localização das curvaturas (incluindo as curvas β) nas cadeias polipeptídicas, a direção e o ângulo dessas curvaturas são determinados pelo número e pela localização de resíduos que tendem a formá-las, como Pro, Thr, Ser e Gly. Segmentos da cadeia polipeptídica que interagem entre si são mantidos em suas posições terciárias características por diferentes tipos de interações fracas (e algumas vezes por ligações covalentes, como ligações dissulfeto) entre os segmentos.

Algumas proteínas contêm duas ou mais cadeias polipeptídicas distintas, ou subunidades, que podem ser idênticas ou diferentes. O arranjo dessas subunidades proteicas em complexos tridimensionais constitui a **estrutura quaternária**.

Considerando esses níveis mais altos de estrutura, é conveniente separar dois grandes grupos nos quais muitas proteínas podem ser classificadas: **proteínas fibrosas**, com cadeias polipeptídicas arranjadas em longos filamentos ou folhas, e **proteínas globulares**, com cadeias polipeptídicas enoveladas em forma esférica ou globular. As estruturas dos dois grupos são diferentes. As proteínas fibrosas, em geral, são formadas por um único tipo de estrutura secundária e sua estrutura terciária é relativamente simples. As proteínas globulares normalmente contêm vários tipos de estruturas secundárias. Os dois grupos também se diferenciam funcionalmente: as estruturas que garantem suporte, forma e proteção externa aos vertebrados são feitas de proteínas fibrosas, ao passo que a maioria das enzimas e das proteínas reguladoras são proteínas globulares.

As proteínas fibrosas são adaptadas às funções estruturais

A α -queratina, o colágeno e a fibroína da seda ilustram bem a relação entre a estrutura da proteína e sua função biológica (Tabela 4-3). As proteínas fibrosas compartilham propriedades que dão força e/ou flexibilidade às estruturas das quais elas fazem parte. Em cada caso, a unidade estrutural fundamental é um elemento simples de estrutura secundária que se repete. Todas as proteínas fibrosas são insolúveis em água, propriedade conferida pela alta concentração de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos tanto no interior quanto na superfície da proteína. Essas superfícies hidrofóbicas estão em grande parte escondidas, visto que muitas

TABELA 4-3 Estrutura secundária e propriedades de algumas proteínas fibrosas

Estrutura	Características	Exemplos de ocorrência
α -Hélice, unida por ligações dissulfeto	Estruturas de proteção insolúveis e resistentes, com dureza e flexibilidade variáveis	α -Queratina do cabelo, penas e unhas
Conformação β	Filamentos macios e flexíveis	Fibroína de seda
Tripla hélice de colágeno	Grande resistência à tração, sem elasticidade	Colágeno de tendões, matriz óssea

cadeias polipeptídicas similares são reunidas, formando um complexo supramolecular. A simplicidade estrutural das proteínas fibrosas as torna muito interessantes para ilustrar alguns dos princípios fundamentais da estrutura proteica discutidos anteriormente.

α -Queratina As α -queratinas evoluíram para serem resistentes. Encontradas somente em mamíferos, essas proteínas constituem praticamente todo o peso seco de cabelos, pelos, unhas, garras, penas, chifres, cascos e grande parte da camada mais externa da pele. As α -queratinas fazem parte de uma família mais ampla de proteínas, chamadas de proteínas de filamento intermediário (FI). Outras proteínas FI são encontradas no citoesqueleto das células animais. Todas as proteínas FI têm função estrutural e têm características estruturais em comum com as α -queratinas.

A hélice da α -queratina é uma α -hélice voltada para a direita, a mesma hélice encontrada em várias outras proteínas. Francis Crick e Linus Pauling, no início de 1950, sugeriram, independentemente, que as α -hélices da queratina estavam arranjadas na forma de espiral enrolada. Duas fibras de α -queratina, orientadas em paralelo (com os respectivos aminoterminais na mesma extremidade), enrolam-se uma sobre a outra, formando uma espiral enrolada supertorcida. A supertorção amplifica a resistência da estrutura como um todo, assim como as fibras são trançadas para formar uma corda bem forte (**Figura 4-11**). A torção do eixo de uma α -hélice para formar uma espiral enrolada explica a discrepância entre os 5,4 Å por volta preditos por Pauling e Corey, e as estruturas repetidas a cada 5,15 a 5,2 Å observadas na difração de raios X do cabelo (p. 152). O sentido da hélice das estruturas supertorcidas é anti-horário, oposto ao da α -hélice. As superfícies na qual as duas α -hélices se tocam são formadas por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos com os grupos R se entrelaçando em um padrão regular interconectado. Isso possibilita um arranjo muito próximo das cadeias polipeptídicas dentro da estrutura supertorcida no sentido anti-horário. Não é surpresa, portanto, que a α -queratina seja rica em resíduos hidrofóbicos Ala, Val, Leu, Ile, Met e Phe.

Um polipeptídeo da α -queratina com as cadeias em espiral enrolada tem uma estrutura terciária relativamente simples, dominada por uma estrutura secundária α -helicoidal, com seu eixo enrolado em uma super-hélice anti-horária. O entrelaçamento de dois peptídeos α -helicoidais é um exemplo de estrutura quaternária. Espirais enroladas desse tipo são elementos estruturais comuns em proteínas filamentosas e na proteína muscular miosina (ver Figura 5-27). A estrutura quaternária da α -queratina pode ser bem complexa. Várias espirais enroladas podem ser associadas em grandes complexos supramoleculares semelhantes ao arranjo da α -queratina para formar o filamento intermediário do cabelo (**Figura 4-11b**).

A resistência das proteínas fibrosas é aumentada pelas ligações covalentes entre as cadeias polipeptídicas nas “cordas” multi-helicoidais e entre cadeias adjacentes em um arranjo supramolecular. Nas α -queratinas, as ligações entre as cadeias que estabilizam a estrutura quaternária são liga-

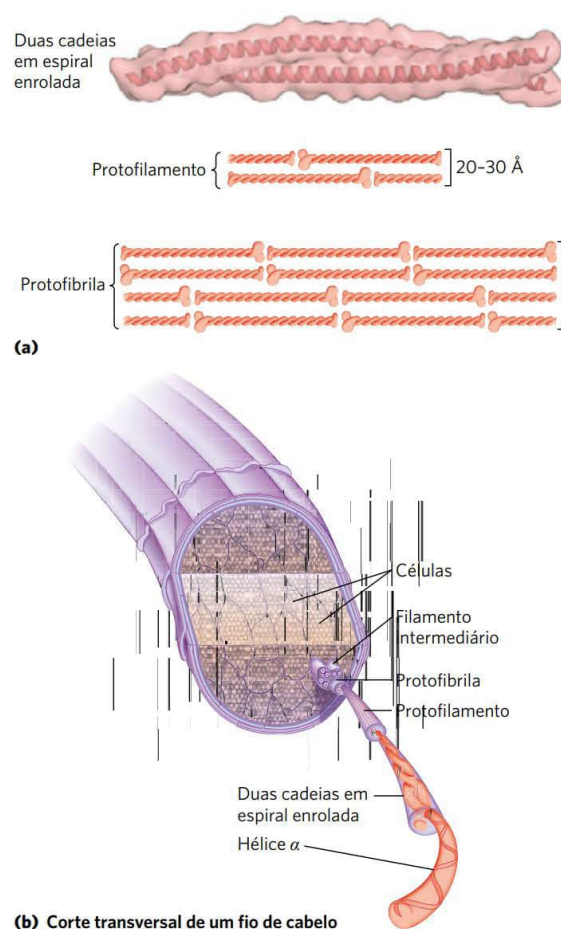
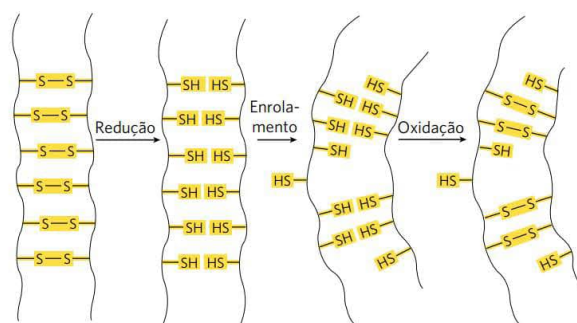


FIGURA 4-11 Estrutura do cabelo. (a) A α -queratina do cabelo é uma longa α -hélice com elementos mais densos próximos às extremidades amino e carboxiterminais. Pares dessas hélices estão enrolados em um sentido anti-horário para formar as duas cadeias em espiral enrolada. Estas, por sua vez, combinam-se em estruturas mais complexas, chamadas de protofilamentos e protofibrilas. Cerca de quatro protofibrilas (32 moléculas de α -queratina ao todo) combinam-se para formar um filamento intermediário. As duas cadeias em espiral enrolada das várias subestruturas também parecem estar entrelaçadas, mas a orientação destas torções e outros detalhes estruturais não são conhecidos. (b) O cabelo é um conjunto de filamentos de α -queratina, formado pelas subestruturas mostradas em (a). [Fonte: (a) PDB ID 3TNU, C. H. Lee et al., *Nature Struct. Mol. Biol.* 19:707, 2012.]

QUADRO 4-2 Cabelo com ondulado permanente é engenharia bioquímica

Quando os cabelos são expostos ao calor úmido, eles podem ser esticados. No nível molecular, as α -hélices da α -queratina do cabelo são esticadas até que cheguem a uma conformação β completamente estendida. Com o resfriamento espontâneo, elas retornam para a conformação α -helicoidal. A “esticabilidade” característica das α -queratinas e suas inúmeras ligações dissulfeto são a base dos processos da ondulação permanente. Os cabelos que serão cacheados ou encrespados são inicialmente enrolados ao redor de uma forma com um formato adequado. Uma solução de um agente redutor, normalmente um composto contendo um grupo tiol ou sulfidril ($-\text{SH}$), é então aplicada com calor. O agente redutor rompe as ligações cruzadas entre as cadeias pela redução de cada ligação dissulfeto em dois resíduos Cys. O calor úmido quebra as ligações de hidrogênio e provoca o desenrolamento da estrutura da cadeia polipeptídica. Depois de um tempo, a solução redutora é removida, e um agente oxidante é adicionado para fazer *novas* ligações dissulfeto entre pares de resíduos Cys de cadeias adjacentes, mas não dos mesmos pares de antes do tratamento. Depois do cabelo lavado e resfriado, as cadeias polipeptídi-

cas voltam à conformação helicoidal. As fibras do cabelo agora estão enroladas da forma desejada porque as novas ligações dissulfeto transversais exercem uma torção ou rotação sobre os feixes de hélices das fibras. O mesmo processo pode ser usado para o alisamento de cabelos naturalmente crespos. Um alisamento permanente de cabelo não é permanente de fato, pois o cabelo cresce; e no cabelo novo que substituirá o antigo, a α -queratina tem o padrão natural de ligações dissulfeto.



ções dissulfeto (Quadro 4-2). Nas α -queratinas mais duras e resistentes, como as dos chifres dos rinocerontes, até 18% dos resíduos são cisteínas envolvidas em ligações dissulfeto.

Colágeno Assim como as α -queratinas, o colágeno evoluiu para garantir resistência. Ele é encontrado em tecidos conectivos, como os tendões, as cartilagens, a matriz orgânica dos ossos e na córnea dos olhos. A hélice de colágeno é uma estrutura secundária única, bem diferente da α -hélice. Ela gira para a esquerda e tem três resíduos de aminoácidos por volta (Figura 4-12 e Tabela 4-1). O colágeno também é uma espiral enrolada, mas com estruturas terciária e quaternária distintas: três polipeptídeos separados, chamados de cadeias α (não confundir com α -hélices), são supertorcidos uns sobre os outros. No colágeno, a torção super-helicoidal tem sentido horário, oposto ao da hélice anti-horária das cadeias α .

Existem vários tipos de colágenos nos vertebrados. Em geral, eles contêm em torno de 35% de Gly, 11% de Ala e 21% de Pro e 4-Hyp (4-hidroxiprolina, um aminoácido incomum; ver Figura 3-8a). A gelatina comestível é derivada do colágeno. Ela tem baixo poder nutricional como proteína, pois o colágeno tem uma quantidade muito baixa de aminoácidos essenciais para a dieta humana. O conteúdo de aminoácidos incomuns do colágeno está relacionado com as restrições estruturais únicas da sua hélice. A sequência de aminoácidos no colágeno geralmente é uma repetição de uma unidade tripeptídica, Gly-X-Y, em que X normalmente é uma Pro, e Y em geral é uma 4-Hyp. Somente os resíduos Gly podem ser acomodados nas junções muito apertadas entre as cadeias α (Figura 4-12b). Os resíduos Pro e 4-Hyp permitem a torção acentuada encontrada na hélice do colágeno. A sequência de aminoácidos e a estrutura quaternária supertorcida do colágeno permitem uma compactação muito justa de seus três polipeptídeos. A 4-hidroxiprolina tem um papel importante na estrutura do colágeno – e na história da humanidade (Quadro 4-3).

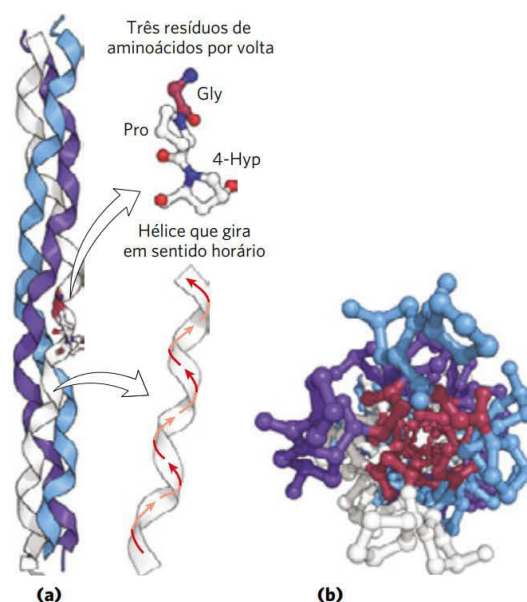


FIGURA 4-12 Estrutura do colágeno. (a) A cadeia α do colágeno tem uma estrutura secundária repetitiva que é única desta proteína. A sequência tripeptídica que se repete Gly-X-Pro ou Gly-X-4-Hyp adota uma estrutura helicoidal anti-horária com três resíduos por volta. A sequência repetida para gerar este modelo é a Gly-Pro-4-Hyp. Três destas hélices (mostradas aqui em cinza, azul e roxo) se enrolam uma sobre as outras, no sentido horário. (b) A super-hélice de colágeno formada por três cadeias, mostrada a partir de uma das extremidades, está representada em um modelo de esfera e bastão. Os resíduos de Gly estão em vermelho. A glicina, por ser pequena, é necessária para uma junção firme na região onde as três cadeias entram em contato. As esferas nesta ilustração não representam os raios de van der Waals dos átomos individuais. O centro da super-hélice de três cadeias não é oco, como aparece aqui, mas sim firmemente compacto. [Fonte: modificada de PDB ID 1CGD, J. Bella et al., *Structure* 3:893, 1995.]

QUADRO 4-3



MEDICINA

Por que marinheiros, exploradores e universitários devem comer frutas e vegetais frescos

“... por um azar, junto com a insalubridade do país, onde nunca cai uma gota de chuva, fomos acometidos pela “doença”, que era tal que toda a carne de nossos braços murchou, e a pele de nossas pernas ficou com manchas escuras, com pedaços bolorentos, como uma bota velha; e uma carne esponjosa surgiu nas gengivas daqueles que pegaram a doença, e ninguém escapou dela, indo direto para as garras da morte. O sinal era: quando o nariz começava a sangrar, então a morte estava próxima.”

—*The Memoirs of the Lord of Joinville*, ca. 1300*

Essa passagem descreve a situação do exército de Luís IX no fim da Sétima Cruzada (1248-1254), quando o exército, enfraquecido pelo escorbuto, foi destruído pelos egípcios. Qual a natureza do mal que acometeu esses soldados do século treze?

O escorbuto é causado pela falta de vitamina C, ou ácido ascórbico (ascorbato). A vitamina C é necessária para, entre outras coisas, a hidroxilação da prolina e da lisina no colágeno. O escorbuto é uma doença que se caracteriza por degeneração do tecido conectivo. As manifestações de escorbuto em estágio avançado incluem inúmeras pequenas hemorragias, causadas por vasos sanguíneos frágeis, perda dos dentes, difícil cicatrização de feridas e reabertura de feridas antigas, dor e degeneração dos ossos, e, no final, falência cardíaca. Casos mais brandos de deficiência de vitamina C são acompanhados de fadiga, irritabilidade e aumento da gravidade das infecções do trato respiratório. A maioria dos animais sintetiza grande quantidade de vitamina C pela conversão da glicose em ascorbato em quatro etapas enzimáticas. Contudo, no curso da evolução, o homem e alguns outros animais – gorilas, cobiias e morcegos frugívoros – perderam a última enzima dessa rota, devendo obter o ascorbato da dieta. A vitamina C é encontrada em uma grande variedade de frutas e vegetais. Até 1800, entretanto, os alimentos desidratados e outros suprimentos alimentares estocados para o inverno ou para longas viagens não continham vitamina C.

O escorbuto foi registrado pelos egípcios em 1500 a.C., e descrito nos escritos de Hipócrates, que datam do quinto século a.C. Entretanto, ele não era muito conhecido até as viagens de descobrimento europeias de 1500 a 1800. A primeira navegação ao redor do mundo (1519-1522), liderada por Fernão de Magalhães, acabou com a perda de mais de 80% da tripulação devido ao escorbuto. Durante a segunda viagem de Jacques Cartier para explorar o rio St. Lawrence (1535-1536), a tripulação foi ameaçada por um completo desastre, até que um índio americano ensinou os homens a fazer chá de cedro (contendo vitamina C), que curava e prevenia o escorbuto. As epidemias de escorbuto nos invernos da Europa

foram gradativamente sendo eliminadas no século XIX, à medida que a cultura de batata, originária da América do Sul, foi disseminada.

Em 1747, James Lind, médico escocês da Marinha Real inglesa, realizou o primeiro estudo clínico controlado registrado na história. Durante uma longa viagem no navio de guerra *HMS Salisbury*, Lind selecionou 12 marinheiros com escorbuto e os dividiu em grupos de dois. Todos os 12 receberam a mesma dieta, exceto que cada um dos grupos recebeu um remédio diferente, entre os recomendados na época, para o escorbuto. Os marinheiros que receberam limões e laranjas se recuperaram e voltaram ao trabalho. Os marinheiros que receberam suco de maçã fervida tiveram uma pequena melhora. Os outros continuaram a piorar. O *Tratado sobre escorbuto* de Lind foi publicado em 1753, mas a inércia permaneceu na Marinha Real por mais 40 anos. Em 1795, o Ministério da Marinha Britânica finalmente ordenou que fosse dada uma ração com suco concentrado de lima ou limão para todos os marinheiros britânicos. O escorbuto continuou a ser um problema em algumas partes do mundo até 1932, quando o cientista húngaro Albert Szent-Györgyi, e W. A. Waugh e C. G. King da Universidade de Pittsburgh isolaram e sintetizaram o ácido ascórbico.

O ácido L-ascórbico (vitamina C) é um pó branco, inodoro e cristalino, totalmente solúvel em água e relativamente insolúvel em solventes orgânicos. O pó seco, longe da luz, é estável por um tempo considerável. O consumo diário apropriado dessa vitamina ainda é alvo de debates. Nos Estados Unidos, os valores recomendados para a ingestão diária são de 90 mg para homens e 75 mg para mulheres. No Reino Unido, a recomendação é de 40 mg, na Austrália, de 45 mg, e na Rússia, de 50 a 100 mg. Além das frutas cítricas e praticamente todas as frutas frescas, pimentas, tomates, batatas e brócolis são boas fontes. A vitamina C de frutas e vegetais é destruída pelo cozimento excessivo ou longa estocagem.

Por que o ascorbato é tão necessário para uma boa saúde? O seu papel na formação de colágeno tem grande importância. Como mencionado anteriormente, o colágeno é formado por unidades repetidas de tripeptídeos Gly-X-Y, dos quais X e Y em geral são Pro e 4-Hyp – o derivado de prolina (4R)-L-hidroxiprolina, que tem um papel importante no entrelaçamento das fibras do colágeno e na manutenção de sua estrutura. O anel de pro-



James Lind, 1716-1794; médico da marinha, 1739-1748
[Fonte: Library, Archive and Family History Enquiries, Royal College of Physicians of Edinburgh.]

*Ethel Wedgwood, *The Memoirs of the Lord of Joinville: A New English Version*, E. P. Dutton and Company, 1906.

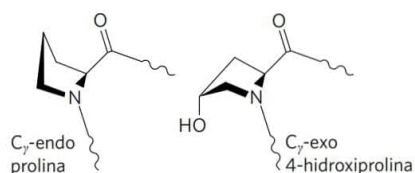


FIGURA Q-1 Conformação C_{γ} -endo da prolina e conformação C_{γ} -exo da 4-hidroxiprolina.

lina normalmente é encontrado em duas conformações, chamadas de C_{γ} -endo e C_{γ} -exo (Figura Q-1). A estrutura da hélice de colágeno necessita de resíduos de Pro na posição Y para estar na conformação C_{γ} -exo, sendo essa conformação favorecida pela substituição por uma hidroxila em C-4 que ocorre na 4-Hyp. A estrutura de colágeno também requer que o resíduo Pro na posição X tenha uma conformação C_{γ} -endo, e a introdução da 4-Hyp nessa posição pode desestabilizar a hélice. Na ausência de vitamina C, as células não conseguem hidroxilar a Pro da posição Y. Isso leva a uma instabilidade do colágeno e aos problemas no tecido conectivo observados no escorbuto.

A hidroxilação de resíduos específicos de Pro no pró-colágeno, o precursor do colágeno, requer a ação da enzima prolil-4-hidroxilase. Em todos os vertebrados, essa enzima (M_r 240.000) apresenta-se como um tetrâmero $\alpha_2\beta_2$. A atividade de hidroxilação da prolina está nas subunidades α . Cada subunidade α contém um átomo de ferro não hemínico (Fe^{2+}), e a enzima faz parte de uma

classe de hidroxilases que necessitam de α -cetoglutarato em suas reações.

Em uma reação normal da prolil-4-hidroxilase (Figura Q-2a), uma molécula de α -cetoglutarato e uma de O_2 se ligam à enzima. O α -cetoglutarato é oxidativamente descarboxilado para formar CO_2 e succinato. O átomo de oxigênio remanescente é, então, usado para hidroxilar o resíduo de Pro apropriado no pró-colágeno. Nenhum ascorbato é necessário nessa reação. Entretanto, a prolil-4-hidroxilase também catalisa uma descarboxilação oxidativa de α -cetoglutarato não acoplada à hidroxilação da prolina (Figura Q-2b). Durante essa reação, o Fe^{2+} do grupamento heme se oxida, inativando a enzima e impedindo a hidroxilação da prolina. O ascorbato consumido nessa reação é necessário para restaurar a atividade enzimática – pela redução do ferro do grupamento heme.

O escorbuto permanece sendo um problema ainda hoje, não somente em regiões remotas onde há escassez de alimentos nutritivos, mas, surpreendentemente, nos *campi* de universidades americanas. Os únicos vegetais consumidos pelos estudantes são na forma de salada, e os dias se passam sem que esses jovens consumam frutas frescas. Um estudo de 1998, com 230 estudantes da Arizona State University, revelou que 10% deles tinham sérias deficiências de vitamina C e dois estudantes tinham níveis de vitamina C tão baixos que provavelmente tinham escorbuto. Somente metade dos estudantes nessa pesquisa consumia a quantidade diária recomendada de vitamina C.

Então, consuma vegetais e frutas frescos.

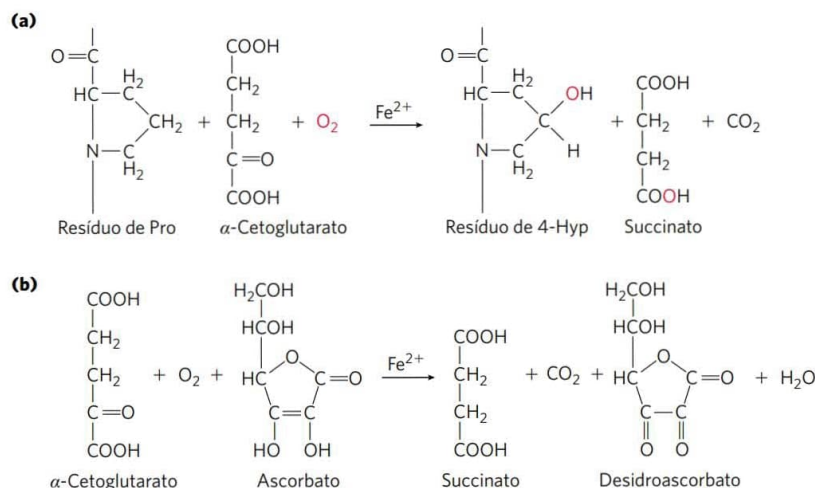


FIGURA Q-2 Reações catalisadas pela prolil-4-hidroxilase. **(a)** Reação usual, acoplada à hidroxilação da prolina, que não necessita de ascorbato. O destino dos dois átomos de oxigênio do O_2 é mostrado em vermelho. **(b)** Reação não acoplada, na qual o α -cetoglutarato sofre descarboxilação oxidativa sem a hidroxilação da prolina. O ascorbato é consumido estequiometricamente neste processo, à medida que é convertido a desidroascorbato, evitando a oxidação do Fe^{2+} .

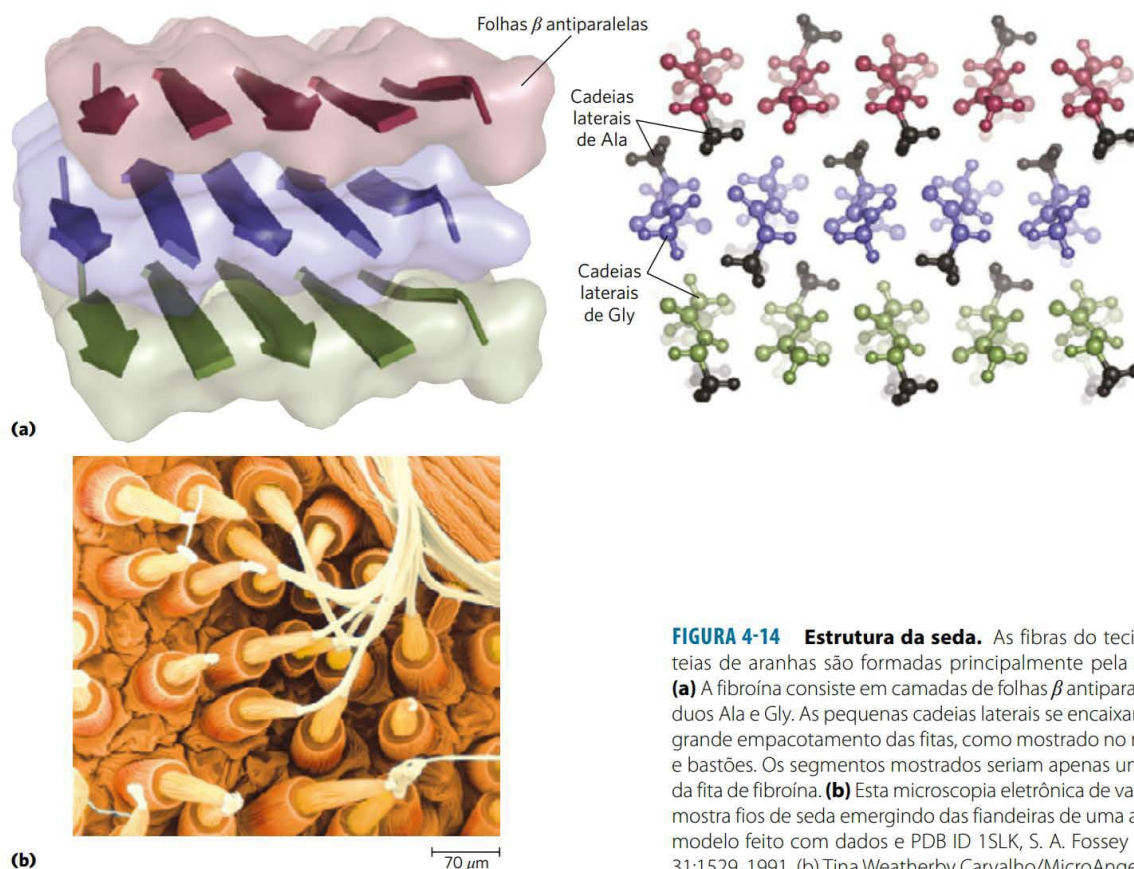


FIGURA 4-14 Estrutura da seda. As fibras do tecido da seda e das teias de aranhas são formadas principalmente pela proteína fibroína. **(a)** A fibroína consiste em camadas de folhas β antiparalelas ricas em resíduos Ala e Gly. As pequenas cadeias laterais se encaixam e permitem um grande empacotamento das fitas, como mostrado no modelo de esferas e bastões. Os segmentos mostrados seriam apenas uma pequena parte da fita de fibroína. **(b)** Esta microscopia eletrônica de varredura colorizada mostra fios de seda emergindo das fiandeiras de uma aranha. [Fontes: (a) modelo feito com dados e PDB ID 1SLK, S. A. Fossey et al., *Biopolymers* 31:1529, 1991. (b) Tina Weatherby Carvalho/MicroAngela.]

Essa discussão sobre proteínas globulares começa com os princípios obtidos a partir da elucidação das primeiras estruturas proteicas. Segue-se uma detalhada descrição e classificação comparativa de subestruturas proteicas. Discussões como essas só são possíveis devido à enorme quantidade de informações disponíveis na Internet em bancos de dados públicos, principalmente no Protein Data Bank (Quadro 4-4).

Conformação β
 $2.000 \times 5 \text{ \AA}$

Hélice α
 $900 \times 11 \text{ \AA}$

Forma globular nativa
 $100 \times 60 \text{ \AA}$

FIGURA 4-15 As estruturas proteicas globulares são compactas e variadas. A albumina sérica humana (M_r 64.500) tem 585 resíduos em uma única cadeia. As dimensões apresentadas são aproximadas e correspondem a uma única cadeia polipeptídica caso ela ocorresse em uma conformação β totalmente estendida, ou em uma α -hélice. Também é mostrado o tamanho da proteína em sua forma globular nativa, determinada por cristalografia por raios X; a cadeia polipeptídica deve estar com um enovelamento muito compacto para caber nestas dimensões.

A mioglobina forneceu as primeiras noções sobre a complexidade da estrutura globular proteica

O primeiro avanço no entendimento da estrutura tridimensional de uma proteína globular veio com os estudos de difração por raios X da mioglobina, feitos por John Kendrew e colaboradores, em 1950. A mioglobina é uma proteína relativamente pequena (M_r 16.700) que liga oxigênio e está presente em células musculares. Ela funciona tanto para a estocagem de oxigênio quanto para facilitar a difusão do oxigênio nos tecidos musculares em contração. A mioglobina contém uma única cadeia polipeptídica de 153 resíduos de aminoácidos de sequência conhecida e um único grupo ferro-protoporfirina, ou heme. O mesmo grupo heme encontrado na mioglobina é encontrado na hemoglobina, a proteína ligadora de oxigênio dos eritrócitos. O grupo heme é responsável pela coloração vermelha amarronzada tanto da mioglobina quanto da hemoglobina. A mioglobina é especialmente abundante nos músculos de mamíferos mergulhadores, como as baleias, as focas e os botos. Ela é tão abundante que os músculos desses animais são marrons. A estocagem e a distribuição do oxigênio pela mioglobina do músculo permitem que animais que mergulham permaneçam submersos por um longo período. As atividades da mioglobina e de outras moléculas de globina são investigadas em detalhes no Capítulo 5.

QUADRO 4-4 O Protein Data Bank

Atualmente, o número de estruturas proteicas tridimensionais conhecidas está na casa das dezenas de milhares e mais do que dobra a cada dois anos. Essa abundância de informações está revolucionando o entendimento sobre a estrutura de proteínas, a relação estrutura-função e as etapas de evolução pelas quais as proteínas chegaram ao seu estado atual, que são evidenciadas pelas semelhanças que aparecem entre as famílias à medida que os bancos de dados de proteínas são examinados e organizados. Um dos recursos mais importantes disponíveis aos bioquímicos é o **Protein Data Bank (PDB)**, ou Banco de Dados de Proteínas; www.rcsb.org.

O PDB é um arquivo com estruturas tridimensionais de macromoléculas biológicas que foram determinadas experimentalmente e contém quase todas as estruturas macromoleculares (proteínas, RNA, DNA, etc.) elucidadas até o momento. A cada estrutura é atribuído um código de identificação (um código de quatro caracteres,

chamado de PDB ID). Tais identificadores são fornecidos nas legendas das figuras para cada uma das estruturas derivadas do PDB ilustradas neste texto, de forma que os estudantes e os professores podem explorar essas estruturas por si mesmos. Os arquivos de dados no PDB descrevem as coordenadas espaciais de cada átomo cuja posição foi determinada (muitas das estruturas catalogadas não estão completas). Arquivos de dados adicionais fornecem informações de como as estruturas foram determinadas e com que grau de precisão. As coordenadas atômicas podem ser convertidas em uma imagem da macromolécula com a ajuda de programas de visualização de estruturas. Os estudantes devem se sentir encorajados a acessar o PDB e explorar as estruturas usando programas de visualização referenciados no banco de dados. Os arquivos de estruturas macromoleculares também podem ser baixados e explorados no seu próprio computador, usando programas livres, como o JSmol.

A **Figura 4-16** mostra diversas representações estruturais da mioglobina, ilustrando como a cadeia polipeptídica é enovelada nas três dimensões – a estrutura terciária. O grupo vermelho envolvido pela proteína é o heme. O esqueleto da molécula de mioglobina consiste em oito segmentos de α -hélices relativamente retas, interrompidas por dobras, algumas delas sendo curvas β . A α -hélice mais longa tem 23 resíduos de aminoácidos, e a mais curta, apenas 7. Todas as hélices são voltadas para a direita. Mais de 70% dos resíduos de mioglobina estão nessas regiões α -helicoidais. Análises por raios X revelaram a posição precisa de cada um dos grupos R, que preenchem quase todo o espaço dentro da cadeia enovelada não ocupada por átomos do esqueleto.

Várias conclusões importantes podem ser tiradas a partir da estrutura da mioglobina. As posições das cadeias laterais dos aminoácidos refletem uma estrutura cuja estabilidade resulta do efeito hidrofóbico. A maioria dos grupos R hidrofóbicos está no interior da molécula, escondidos da

exposição à água. Exceto dois resíduos, todos os demais grupos R polares estão na superfície externa da molécula e estão hidratados. A molécula de mioglobina é tão compacta que, em seu interior, só há lugar para quatro moléculas de água. Esse denso núcleo hidrofóbico é típico das proteínas globulares. Em um líquido orgânico, a proporção de espaço ocupado pelos átomos é de 0,4 a 0,6. Em uma proteína globular, essa proporção é de cerca de 0,75, comparável com aquela dos cristais (em um cristal típico, a fração é de 0,70 a 0,78, próximo do máximo teórico). Nesse ambiente compacto, as interações fracas são fortalecidas e se reforçam umas às outras. Por exemplo, as cadeias apolares no núcleo estão tão próximas que as interações de curto alcance do tipo van der Waals têm uma contribuição significativa na estabilização das interações hidrofóbicas.

A dedução da estrutura da mioglobina confirmou algumas expectativas e introduziu alguns elementos novos quanto ao conhecimento de estruturas secundárias. Como

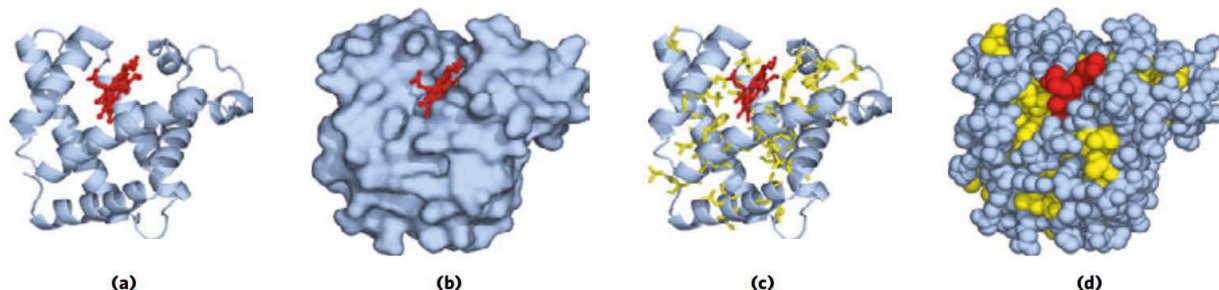


FIGURA 4-16 Estrutura terciária da mioglobina de cachalote. A orientação da proteína é igual de (a) a (d); o grupo heme está mostrado em vermelho. Além de ilustrar a estrutura da mioglobina, esta figura mostra exemplos das diversas formas de representar a estrutura de uma proteína. **(a)** Esqueleto polipeptídico na representação em fita, introduzido por Jane Richardson, destacando as estruturas secundárias. As regiões de α -hélice ficam evidentes. **(b)** Imagem da superfície da proteína; ela é útil na visualização de fendas ou bolsões onde outras moléculas podem se ligar à proteína. **(c)** Representação da estrutura em fita, incluindo as cadeias laterais (em amarelo) dos resíduos hidrofóbicos Leu, Ile, Val e Phe. **(d)** Modelo de volume atômico com todas as cadeias laterais dos aminoácidos. Cada átomo está representado por uma esfera que corresponde ao seu raio de van der Waals. Os resíduos hidrofóbicos estão novamente mostrados em amarelo; a maioria está no interior da proteína, e por isso não está visível. [Fonte: PDB ID 1MBO, S. E. Phillips, *J. Mol. Biol.* 142:531, 1980.]

foi predito por Pauling e Corey, todas as ligações peptídicas estão em configuração planar *trans*. As α -hélices da mioglobina forneceram a primeira evidência experimental direta da existência desse tipo de estrutura secundária. Três dos quatro resíduos Pro são encontrados em curvaturas. O quarto resíduo Pro ocorre em uma α -hélice, onde ele cria uma torção necessária para o firme empacotamento da hélice.

O grupo heme planar repousa sobre uma fenda na molécula de mioglobina. O átomo de ferro no centro do grupo heme tem duas posições de ligação (coordenação) perpendiculares ao plano do heme (Figura 4-17). Uma delas está ligada ao grupo R de um resíduo de His na posição 93 e a outra corresponde ao local de ligação da molécula de O_2 . Dentro desta fenda, a acessibilidade do grupo heme ao solvente é muito restrita. Isso é importante para a função, pois grupos heme livres em uma solução contendo oxigênio são rapidamente oxidados do estado ferroso (Fe^{2+}), que atua na ligação reversível com o O_2 , para o estado férrico (Fe^{3+}), que não se liga ao O_2 .

À medida que as diferentes estruturas da mioglobina foram sendo determinadas, os pesquisadores foram capazes de entender as mudanças estruturais que acompanham a ligação do oxigênio ou de outra molécula, e, assim, pela primeira vez, entender a correlação entre a estrutura de uma proteína e a sua função. Até o momento, várias centenas de proteínas já foram alvo de análises como essas. Hoje, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e outras técnicas complementam os dados de difração de raios X, fornecendo, assim, mais informações sobre as estruturas proteicas (Quadro 4-5). Além disso, o sequenciamento do DNA genômico de muitas espécies de organismos (Capítulo 9) identificou milhares de genes que codificam proteínas com sequências conhecidas, mas com funções ainda desconhecidas; esse trabalho continua a passos largos.

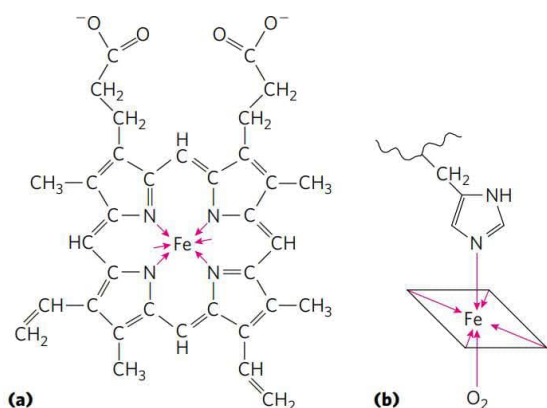


FIGURA 4-17 O grupo heme. Este grupo está presente na mioglobina, na hemoglobina, nos citocromos e em muitas outras proteínas (as proteínas heme). (a) O heme é uma estrutura de anel orgânico complexa, a protoporfirina, que liga um átomo de ferro no estado ferroso (Fe^{2+}). O átomo de ferro tem seis ligações coordenadas, quatro delas no plano da molécula da porfirina (e ligadas a ela) e duas perpendiculares a esse plano. (b) Na mioglobina e na hemoglobina, uma dessas ligações perpendiculares está ligada a um átomo de nitrogênio de um resíduo His. A outra está "vaga", servindo de sítio de ligação para a molécula de O_2 .

TABELA 4-4 Proporção aproximada de α -hélices e conformações β em algumas proteínas de cadeia única

Proteína (número total de resíduos)	Resíduos (%) ^a	
	α -Hélice	Conformação β
Quimotripsina (247)	14	45
Ribonuclease (124)	26	35
Carboxipeptidase (307)	38	17
Citocromo c (104)	39	0
Lisozima (129)	40	12
Mioglobina (153)	78	0

Fonte: dados de C. R. Cantor e P. R. Schimmel, *Biophysical Chemistry, Part I: The Conformation of Biological Macromolecules*, p. 100, W. H. Freeman and Company, 1980.

^aAs proporções das cadeias polipeptídicas que não fazem parte de α -hélices e conformações β consistem em curvaturas e espirais irregulares ou regiões estendidas. Algumas vezes, os segmentos de α -hélice e conformação β diferem um pouco das suas respectivas dimensões e geometrias normais.

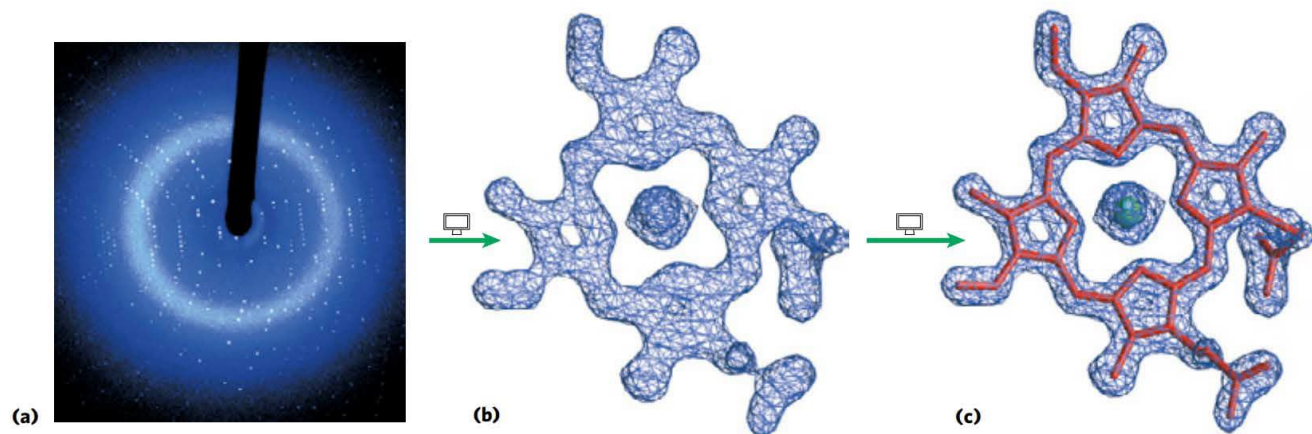
As proteínas globulares têm grande diversidade de estruturas terciárias

A partir do que se sabe sobre estruturas terciárias de centenas de proteínas globulares, é claro que a mioglobina ilustra apenas uma das muitas formas nas quais as cadeias polipeptídicas podem se enovelar. A Tabela 4-4 mostra as proporções de α -hélices e conformações β (expressas em porcentagem de resíduos em cada um dos tipos) em diversas proteínas globulares pequenas e de cadeia única. Cada uma dessas proteínas tem uma estrutura diferente, adaptada à sua função biológica específica, mas todas compartilham diversas propriedades importantes com a mioglobina. Cada uma delas está enovelada de forma compacta e, em cada caso, as cadeias laterais hidrofóbicas dos aminoácidos estão orientadas para o centro da proteína (longe da água), e as cadeias laterais hidrofílicas ficam na superfície da proteína. As estruturas também são estabilizadas por muitas ligações de hidrogênio e algumas interações iônicas.

Quem está começando a estudar proteínas poderá entender com mais facilidade as estruturas altamente complexas das proteínas globulares (algumas são muito maiores do que a mioglobina), concentrando-se nos padrões estruturais comuns que aparecem nas mais diversas proteínas. A estrutura tridimensional de uma proteína globular típica pode ser considerada um conjunto de segmentos polipeptídicos em α -hélices e conformações β , ligados por segmentos conectores. A estrutura pode, então, ser definida pela forma como os segmentos estão empilhados uns sobre os outros e como os segmentos que os conectam estão arranjados.

Para entender uma estrutura tridimensional completa é preciso analisar o seu padrão de enovelamento. Primeiro, define-se dois importantes termos que descrevem os padrões estruturais das proteínas ou elementos de uma cadeia polipeptídica e depois segue-se as regras de enovelamento.

O primeiro termo é **motivo**, também chamado de **enovelamento** ou mais raramente de **estrutura supersecundária**. Um motivo ou enovelamento é um padrão de enovelamento identificável, envolvendo dois ou mais

QUADRO 4-5 MÉTODOS Métodos de determinação da estrutura tridimensional das proteínas**Difração de raios X**

O espaçamento dos átomos em um retículo cristalino pode ser determinado pela medida da localização e da intensidade dos pontos produzidos por um feixe de raios X de um dado comprimento de onda em um filme fotográfico, após esse feixe ser difratado pelos elétrons dos átomos presentes no cristal. Por exemplo, a análise por raios X de cristais de cloreto de sódio mostra que os íons Na^+ e Cl^- estão dispostos em um arranjo cúbico simples. O espaçamento de diferentes tipos de átomos em moléculas orgânicas complexas, até mesmo moléculas grandes como as proteínas, também pode ser analisado por métodos de difração de raios X. Entretanto, essa técnica de análise de cristais de moléculas complexas é muito mais trabalhosa do que no caso de cristais de sais simples. No caso do padrão de repetição do cristal de moléculas com tamanhos tão grandes como as proteínas, o enorme número de átomos da molécula produz milhares de pontos de difração, que precisam ser analisados por computador.

Considere como as imagens são geradas em um microscópio óptico. A luz de uma fonte pontual é focalizada em um objeto. O objeto espalha as ondas de luz, e essas ondas espalhadas são reagrupadas por uma série de lentes para gerar uma imagem aumentada do objeto. O tamanho mínimo do objeto cuja estrutura pode ser determinada dessa forma – isto é, o poder de resolução do microscópio – é determinado pelo comprimento de onda de luz, neste caso, a luz visível (comprimento de onda entre 400 e 700 nm). Objetos menores do que a metade do comprimento de onda da luz incidente não podem ser resolvidos. Para resolver objetos tão pequenos quanto as proteínas, é necessário usar raios X, com comprimentos de onda na faixa de 0,7 a 1,5 Å (0,07 a 0,15 nm). Entretanto, não há lentes que possam reagrupar os raios X para formar a imagem. Em vez disso, o padrão de difração de raios X é coletado diretamente, e a imagem é reconstruída por técnicas matemáticas.

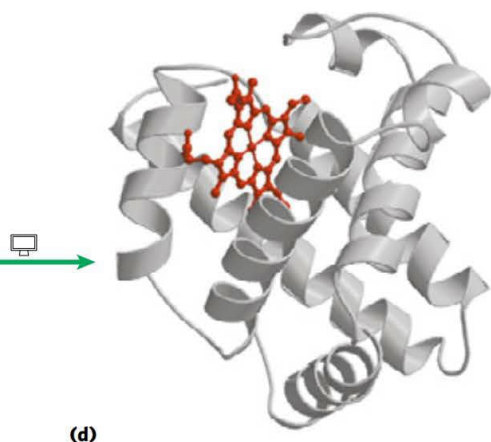
A quantidade de informação obtida em uma cristalografia por raios X depende do grau de organização estrutural da amostra. Alguns parâmetros importantes foram

obtidos nos primeiros estudos acerca dos padrões de difração de proteínas fibrosas organizadas de forma regular no cabelo e na lã. Entretanto, os feixes ordenados formados pelas proteínas fibrosas não são cristais – as moléculas estão alinhadas lado a lado, mas nem todas estão orientadas na mesma direção. Informações estruturais tridimensionais mais detalhadas sobre proteínas necessitam de um cristal de proteína altamente ordenado. As estruturas de muitas proteínas ainda permanecem desconhecidas, simplesmente porque elas são difíceis de cristalizar. Os profissionais que trabalham nessa área comparam a preparação de cristais com manter unida uma pilha de bolas de boliche com uma fita de celofane.

Operacionalmente, existem vários passos em uma análise de estrutura por raios X (Figura Q-1). Um cristal é colocado entre uma fonte de feixes de raios X e o detector e é gerado um conjunto regular de pontos, chamados de reflexões. Os pontos são gerados pela difração do feixe de raios X, e cada átomo da molécula dá uma contribuição para cada ponto. Um mapa de densidade eletrônica da proteína é reconstruído a partir do padrão total de difração usando uma técnica matemática denominada transformada de Fourier. O computador age, na verdade, como “lente computacional”. Um modelo da estrutura é então construído de acordo com o mapa de densidade eletrônica.

John Kendrew verificou que o padrão de difração de raios X da mioglobina cristalina (isolada de músculos do cachalote) é muito complexo, com cerca de 25 mil reflexões. A análise computacional dessas reflexões ocorreu em etapas. A resolução foi aumentando a cada etapa, até que, em 1959, as posições de quase todos os átomos de hidrogênio foram determinadas. A sequência de aminoácidos da proteína, obtida por análise química, foi consistente com o modelo molecular. Desde então, as estruturas de milhares de proteínas, a maioria delas mais complexa que a mioglobina, foram determinadas com um nível de resolução semelhante.

É claro que o ambiente físico em um cristal não é idêntico ao ambiente em solução ou em uma célula viva.



O cristal impõe uma média temporal e espacial na estrutura deduzida a partir da análise, e os estudos de difração de raios X fornecem poucas informações sobre os movimentos moleculares no interior da proteína. A conformação das proteínas em um cristal pode, a princípio, ser afetada por fatores não fisiológicos, como contatos proteína-proteína, dentro do cristal. Entretanto, quando estruturas obtidas pela análise de cristais são comparadas com informações estruturais obtidas de outras formas (como RMN, descrita a seguir), as estruturas obtidas do cristal quase sempre representam a conformação funcional da proteína. A cristalografia por raios X pode ser aplicada com sucesso a proteínas grandes demais para serem estruturalmente analisadas por RMN.

Ressonância magnética nuclear

Uma vantagem dos estudos de ressonância magnética nuclear (RMN) é que eles são realizados com as macromoléculas em solução, ao passo que a cristalografia é limitada a moléculas que podem ser cristalizadas. A RMN também pode esclarecer o lado dinâmico da estrutura da proteína, incluindo mudanças conformacionais, enovelamento proteico e interação com outras moléculas.

A RMN é a manifestação do momento angular do *spin* nuclear, uma propriedade quântico-mecânica dos núcleos atômicos. Somente alguns átomos, incluindo ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F e ^{31}P , apresentam o tipo de *spin* nuclear que gera sinal na RMN. O *spin* nuclear gera um dipolo magnético. Quando um campo magnético estático e forte é aplicado a uma solução contendo um único tipo de macromolécula, os dipolos magnéticos são alinhados no campo em uma das duas orientações, paralela (baixa energia) ou antiparalela (alta energia). Um curto ($\sim 10 \mu\text{s}$) pulso de energia eletromagnética de frequência adequada (a frequência de ressonância, que está dentro da faixa de radiofrequência) é aplicado, em certos ângulos, aos núcleos alinhados no campo magnético. Uma certa quantidade de energia é absorvida à medida que o núcleo muda para o estado de maior energia, e o espectro de absorção resultante contém informações sobre a identidade do nú-

FIGURA Q-1 Etapas da determinação da estrutura da mioglobina de cachalote por meio de cristalografia por raios X. **(a)** O padrão da difração de raios X é gerado a partir de um cristal da proteína. **(b)** Os dados obtidos pelo padrão de difração são utilizados para calcular um mapa de densidade eletrônica tridimensional. Somente a densidade eletrônica do heme, uma pequena parte da estrutura, está mostrada. **(c)** As regiões de maior densidade eletrônica revelam a localização do núcleo atômico, e essa informação é utilizada para construir a estrutura final. Aqui, a estrutura do heme é modelada no mapa de densidade eletrônica. **(d)** Estrutura completa da mioglobina de cachalote, incluindo o heme. [Fontes: (a, b, c) cortesia de George N. Phillips, Jr., University of Wisconsin-Madison, Department of Biochemistry. (d) PDB ID 2MBW, E. A. Brucker et al., *J. Biol. Chem.* 271:25.419, 1996.]

cleo e o ambiente químico das imediações. Os dados de diversos desses experimentos com uma mesma amostra são reunidos, aumentando a relação sinal-ruído, e é gerado um espectro de RMN, como o mostrado na Figura Q-2.

O ^1H é especialmente importante nos experimentos de RMN, pois é altamente sensível e muito abundante na natureza. Para macromoléculas, o espectro de RMN de ^1H pode ser bem complicado. Até mesmo uma proteína pequena pode ter centenas de átomos de ^1H , normalmente gerando um espectro de RMN unidimensional muito complexo para ser analisado. A análise estrutural de proteínas tornou-se possível com o advento das técnicas de RMN bidimensionais (Figura Q-3). Esses métodos permitem medir o acoplamento, dependente da distância, dos *spins* dos núcleos de átomos próximos no espaço (o efeito Overhauser nuclear [NOE]), em um método chamado de NOESY ou o acoplamento dos *spins* nucleares de átomos conectados por ligações covalentes (espectroscopia de correlação total, ou TOCSY).

A tradução de um espectro de RMN bidimensional em uma estrutura tridimensional completa é um processo muito trabalhoso. Os sinais de NOE fornecem algumas informações sobre as distâncias entre cada um dos átomos, porém, para esses valores de distâncias serem úteis, os átomos que originam cada sinal devem ser identifica-

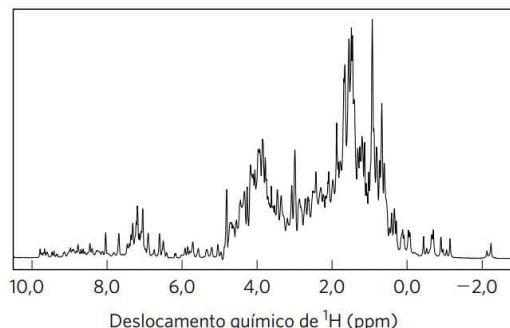


FIGURA Q-2 Espectro de RMN unidimensional da globina de um amêijo-ba. Esta proteína e a mioglobina de cachalote são análogos estruturais muito próximos, pertencem à mesma família estrutural e têm em comum a função de transporte de oxigênio. [Fonte: dados de B. F. Volkman, National Magnetic Resonance Facility at Madison.]

(Continua)

QUADRO 4-5 MÉTODOS Métodos de determinação da estrutura tridimensional das proteínas (Continuação)

dos. Os experimentos complementares de TOCSY podem ajudar na identificação de quais sinais de NOE que refletem átomos estão ligados por ligações covalentes. Certos padrões de sinais de NOE foram associados a estruturas secundárias, como, por exemplo, α -hélices. A engenharia genética (Capítulo 9) pode ser usada para preparar proteínas contendo isótopos raros, como ^{13}C ou ^{15}N . Os novos sinais de RMN produzidos por esses átomos e o acoplamento com os sinais de ^1H resultantes dessa substituição auxiliam na identificação de cada um dos sinais de ^1H NOE. O processo também é facilitado pelo conhecimento da sequência do polipeptídeo.

Para gerar a representação de uma estrutura tridimensional, os pesquisadores colocam em um computador as restrições de distância, junto com as restrições geométricas conhecidas como quiralidade, raios de van der Waals e distância e ângulo de ligação. O computador gera,

então, uma família de estruturas altamente aparentadas que representam um conjunto de conformações consistentes com os valores observados no NOE (Figura Q-3c). A incerteza das estruturas geradas por RMN é, em parte, reflexo das vibrações moleculares que ocorrem dentro de uma proteína, discutidas em mais detalhes no Capítulo 5. O erro experimental normal também influi.

As estruturas proteicas determinadas tanto por cristalografia por raios X como por RMN geralmente coincidem. Em alguns casos, a localização exata de algumas cadeias laterais de determinados aminoácidos da superfície da proteína é diferente, geralmente devido aos efeitos relacionados com a compactação entre proteínas vizinhas no cristal. Em conjunto, as duas técnicas são as responsáveis pelo rápido aumento da disponibilidade de informações sobre as estruturas das macromoléculas das células.

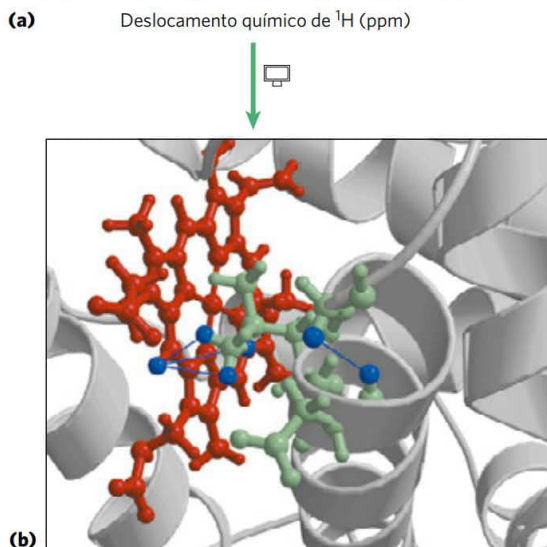
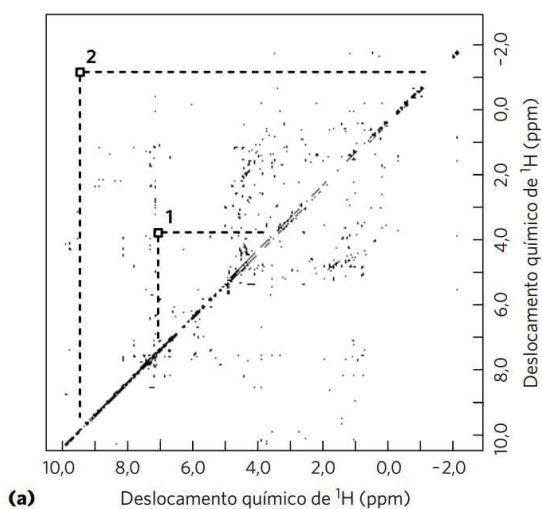
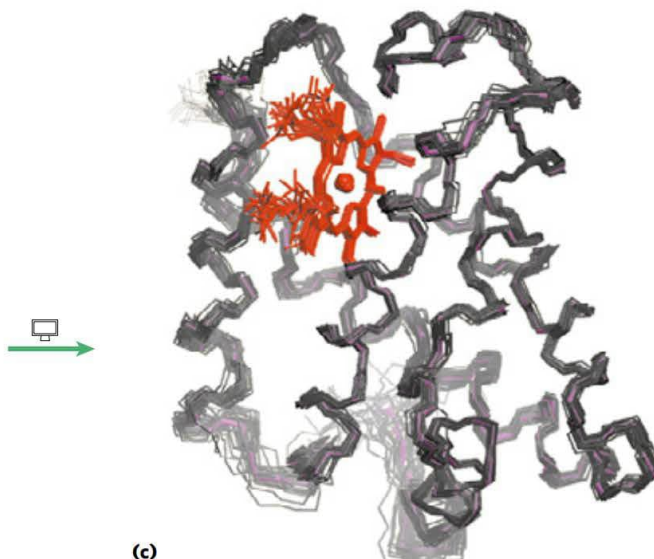


FIGURA Q-3 Uso de RMN bidimensional para determinar a estrutura tridimensional da globina, a mesma proteína usada para gerar os dados da Figura Q-2. Em um espectro de RMN bidimensional, a diagonal é equivalente ao espectro unidimensional. Os picos fora da diagonal são sinais de NOE gerados pelas interações de curto alcance dos átomos de ^1H , que podem gerar sinais bem distantes em um espectro unidimensional. Duas dessas interações estão identificadas em (a) e suas identidades estão mostradas em linhas azuis em (b). Três linhas foram desenhadas para a interação 2 entre um grupo metil da proteína e um hidrogênio do heme. O grupo metil gira rapidamente de forma que cada um dos seus três hidrogênios contribui igualmente para a interação e para o sinal de RMN. Essa informação é usada para determinar a estrutura tridimensional completa, em (c). As várias linhas que mostram o esqueleto da proteína em (c) representam o conjunto de estruturas consistentes com os dados de distância obtidos por RMN. A semelhança estrutural com a mioglobina (Figura Q-1) é evidente. As proteínas estão orientadas da mesma maneira nas duas figuras. [Fontes: dados e ajuda para desenhar a figura por cortesia de B. F. Volkman, National Magnetic Resonance Facility at Madison. (b) PDB ID 1VRF e (c) PDB ID 1VRE, B. F. Volkman et al., *Biochemistry* 37:10,906, 1998.]



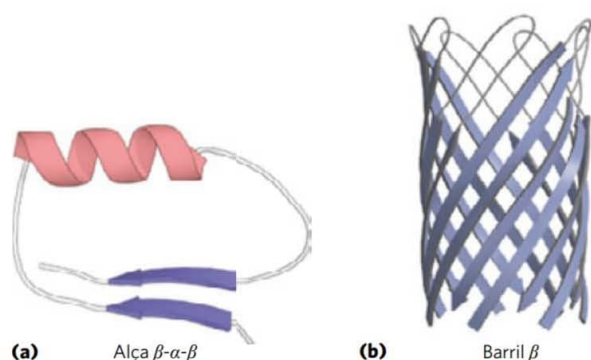


FIGURA 4-18 Motivos estruturais. (a) Um motivo simples, a alça β - α . (b) Um motivo mais elaborado, o barril β . O barril β é o único domínio da α -hemolisina (toxina que mata células por criar um orifício na membrana celular) da bactéria *Staphylococcus aureus*. [Fontes: (a) obtida de PDB ID 4TIM, M. E. Noble et al., *J. Med. Chem.*, 34:2709, 1991. (b) Obtida de PDB ID 7AHL, L. Song et al., *Science* 274:1859, 1996.]

elementos da estrutura secundária e a conexão (ou conexões) entre eles. Um motivo pode ser muito simples, como dois elementos de estrutura secundária dobrados um sobre o outro, e representa apenas uma pequena parte de uma proteína. Um exemplo é a **alça β - α** (Figura 4-18a). Um motivo também pode ter uma estrutura bem elaborada, envolvendo um grande número de segmentos proteicos dobrados juntos, como o barril β (Figura 4-18b). Em alguns casos, um único e grande motivo pode abranger toda a proteína. Os termos “motivo” e “enovelamento” são frequentemente usados como sinônimos, embora “enovelamento” seja mais comumente aplicado aos padrões de enovelamento um pouco mais complexos. Esses termos incluem qualquer padrão favorável de enovelamento e são úteis para descrever esses padrões. O segmento definido como um motivo pode, ou não, ser estável por si mesmo. Já foi mencionado um motivo bem-estudado, a espiral enrolada da estrutura da α -queratina que também é encontrada em outras proteínas. O arranjo característico de oito α -hélices na mioglobina está presente em todas as globinas e é chamado de enovelamento de globina. É importante ter em mente que um motivo não é um elemento estrutural hierárquico que fica entre as estruturas secundária e terciária. Ele é simplesmente um padrão de enovelamento. O termo sinônimo “estrutura supersecundária” pode, portanto, causar confusão, pois sugere uma hierarquia.

O segundo termo que descreve padrões estruturais é **domínio**. Um domínio, como definido por Jane Richardson em 1981, é uma parte da cadeia polipeptídica que é independentemente estável ou pode sofrer movimentos como uma entidade isolada em relação ao resto da proteína. Polipeptídeos com mais de algumas centenas de resíduos de aminoácidos normalmente se enovelam, formando dois ou mais domínios, algumas vezes com funções diferentes. Muitas vezes, um domínio de uma proteína grande conserva a estrutura tridimensional nativa mesmo quando separado (p. ex., por uma clivagem proteolítica) do resto da cadeia polipeptídica. Em uma proteína com vários domínios cada um deles pode aparecer como uma porção globular diferente (Figura 4-19) e é muito comum que contatos extensos entre os domínios tornem difícil discernir entre eles. Do-

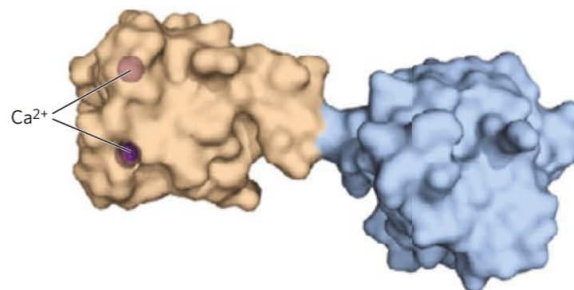


FIGURA 4-19 Domínios estruturais do polipeptídeo troponina C. Esta proteína ligadora de cálcio, encontrada no músculo, tem dois domínios ligadores de cálcio separados, que estão mostrados em marrom e em azul. [Fonte: PDB ID 4TNC, K. A. Satyshur et al., *J. Biol. Chem.* 263:1628, 1988.]

mínios diferentes, em geral, têm funções diferentes, como a ligação de pequenas moléculas ou interação com outras proteínas. Proteínas pequenas normalmente têm somente um domínio (o domínio é a proteína).

O enovelamento dos polipeptídeos está sujeito a uma série de limitações físicas e químicas e foram propostas várias regras com base em estudos de padrões comuns de enovelamento proteico.

1. As interações hidrofóbicas dão uma grande contribuição para a estabilidade da estrutura das proteínas. O ocultamento dos grupos R dos aminoácidos hidrofóbicos, de modo a excluir água, necessita de pelo menos duas camadas de estrutura secundária. Motivos simples como a alça β - α (Figura 4-18a) criam essas duas camadas.
2. Quando ocorrem juntas em uma proteína, as α -hélices e as folhas β geralmente se encontram em camadas estruturais diferentes. Isso ocorre porque um segmento do esqueleto polipeptídico em conformação β (Figura 4-6) não faz, com facilidade, ligações de hidrogênio com uma α -hélice adjacente a ele.
3. Segmentos adjacentes na sequência de aminoácidos normalmente se posicionam de forma adjacente na estrutura enovelada. Segmentos distantes do polipeptídeo podem se aproximar na estrutura terciária, mas não é a regra.
4. A conformação β é mais estável quando cada um dos segmentos está levemente torcido para a direita. Isso influencia tanto o arranjo das folhas β dos segmentos supertorcidos quanto a forma pela qual os polipeptídeos estão conectados entre si. Duas fitas β paralelas, por exemplo, devem estar conectadas por uma fita cruzada (Figura 4-20a). Em princípio, essa fita pode ter uma conformação no sentido horário ou anti-horário, mas o sentido horário é o mais comum de ocorrer nas proteínas. As conexões voltadas para a direita tendem a ser mais curtas do que as conexões voltadas para esquerda e tendem a se dobrar com um ângulo menor, o que faz com que sejam mais fáceis de serem formadas. A torção de folhas β também determina uma torção característica nas estruturas formadas por vários desses segmentos, como pode ser observado no barril β (Figura 4-18b) e na folha β torcida (Figura 4-20c), que forma o núcleo de várias estruturas maiores.

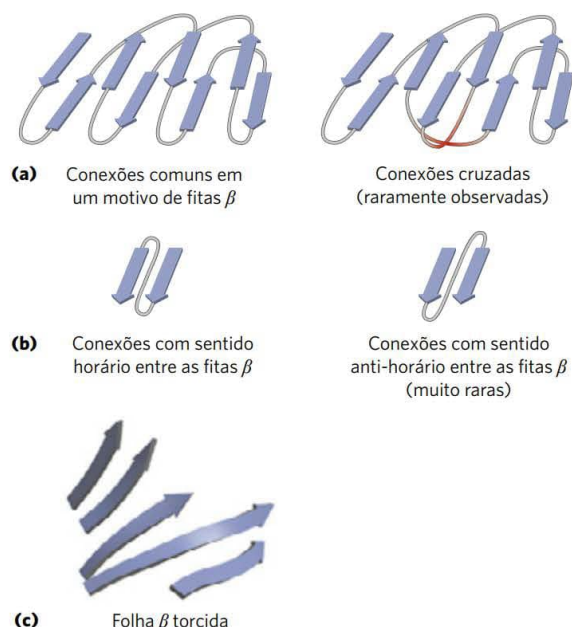


FIGURA 4-20 Padrões de enovelamento estáveis em proteínas.

(a) Conexões entre fitas β em camadas de folhas β . As fitas estão mostradas a partir de uma extremidade, sem torção. As conexões em uma das extremidades (p. ex., aquelas próximas ao observador) raramente se cruzam umas com as outras. Um exemplo de um desses cruzamentos raros está ilustrado na fita amarela da estrutura à direita. (b) Devido à torção para a direita nas fitas β , as conexões entre as fitas, em geral, são no sentido horário. As conexões no sentido anti-horário devem assumir ângulos mais agudos e são mais difíceis de serem formadas. (c) Esta folha β torcida pertence a um domínio da fotoliase (proteína que repara certos tipos de danos ao DNA) de *E. coli*. As alças de conexão foram removidas para que o foco seja o enovelamento da folha β . [Fonte: (c) obtida de PDB ID 1DNP, H. W. Park et al., *Science* 268:1866, 1995.]

Seguindo essas regras, motivos complexos podem ser construídos a partir de motivos mais simples. Por exemplo, um arranjo específico de uma série de alças β - α - β forma o **barril α/β** , um motivo estável muito comum (**Figura 4-21**). Nessa estrutura, cada segmento β paralelo é conectado ao seu vizinho por um segmento α -helicoidal. Todas as conexões são voltadas para a direita. O barril α/β é encontrado em diversas enzimas, geralmente como um sítio de ligação (de um cofator ou substrato) na forma de uma fenda próxima a uma das extremidades do barril. Observe que domínios com padrão semelhante de enovelamento são ditos terem o mesmo motivo, mesmo que as α -hélices e as folhas β que os constituem tenham tamanhos diferentes.

Algumas proteínas ou segmentos proteicos são intrinsecamente desordenados

Apesar de décadas de progresso no entendimento da estrutura das proteínas, muitas proteínas não podem ser cristalizadas e isso dificulta a determinação das suas estruturas tridimensionais pelos métodos agora considerados clássicos (ver Quadro 4-5). Mesmo quando cristalizadas, partes da proteína podem ficar tão desordenadas no cristal que a es-

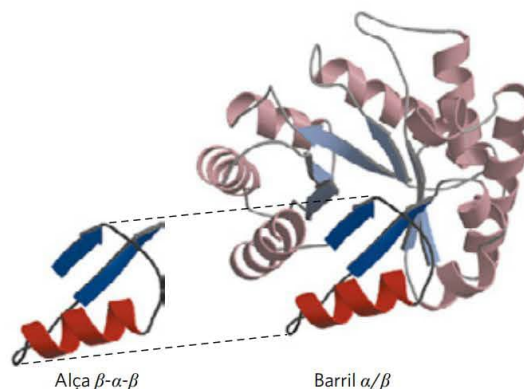


FIGURA 4-21 A construção de domínios maiores a partir de menores. O barril α/β é um motivo que ocorre frequentemente e é formado por repetições de alças com o motivo β - α - β . Esse barril α/β é um domínio na piruvato-cinase (enzima glicolítica) de coelho. [Fonte: obtida de PDB ID 1PKN, T. M. Larsen et al., *Biochemistry* 33:6301, 1994.]

trutura determinada não inclui essas partes. Algumas vezes, isso se deve a características sutis da estrutura que tornam a cristalização difícil. No entanto, a razão pode ser mais simples: algumas proteínas ou segmentos proteicos não formam estruturas ordenadas em solução.

O conceito de que algumas proteínas funcionam sem terem uma estrutura definida é resultado da reavaliação dos dados de muitas proteínas diferentes. Um terço das proteínas do ser humano pode ser de proteínas desestruturadas ou proteínas com segmentos desestruturados significativos. Todos os organismos possuem algumas proteínas que se encaixam nessa categoria. As **proteínas intrinsecamente desordenadas** têm propriedades distintas das proteínas estruturadas clássicas. Elas não têm um núcleo hidrofóbico e, ao contrário, são caracterizadas por alta densidade de aminoácidos carregados, como Lys, Arg e Glu. Resíduos de Pro também são frequentes devido à tendência que eles têm de romper estruturas ordenadas.

A desordem estrutural e a alta densidade de cargas podem facilitar a atividade de algumas proteínas como espaçadores, isoladores ou elementos de ligação em estruturas maiores. Outras proteínas desordenadas são sequestradoras, ligando íons e moléculas pequenas em solução e servindo de reservatórios ou depósitos de restos que a célula já não precisa mais. No entanto, muitas proteínas intrinsecamente desordenadas estão no centro de redes de interações proteicas importantes. A falta de uma estrutura ordenada pode facilitar um tipo de promiscuidade funcional, permitindo que a proteína interaja com muitas moléculas diferentes. Algumas proteínas intrinsecamente desordenadas atuam inibindo a atividade de outras proteínas por um mecanismo que não é comum: enroscar-se em torno das proteínas-alvo. Uma proteína desordenada pode fazer parceria com algumas ou mesmo dúzias de proteínas diferentes. A desordem estrutural permite ao inibidor proteico se enroscar em torno de muitos alvos de diferentes formas. A proteína intrinsecamente desordenada p27 exerce um papel-chave no controle da divisão celular em mamíferos. Essa proteína não tem es-

estrutura definida quando está em solução. Ela se enrola em torno, e assim inibe a atividade, de várias enzimas chamadas proteínas-quinase (ver Capítulo 6) que participam nos mecanismos da divisão celular. A estrutura flexível da p27 permite que ela se acomode a proteínas-alvo distintas. Células de tumor humano, que são simplesmente células que perderam a capacidade de controlar a divisão celular normal, geralmente possuem níveis reduzidos de p27; quanto menor for o nível de p27 pior é o prognóstico para o paciente de câncer. Da mesma forma, as proteínas intrinsecamente desordenadas geralmente estão presentes no ponto central ou no arcabouço de redes proteicas que formam vias de sinalização. Essas proteínas ou partes delas podem interagir com muitas moléculas diferentes. Ao interagirem com outras proteínas elas geralmente passam a ter uma estrutura ordenada, mas as estruturas que elas assumem podem variar de acordo com com a molécula que ligam. A proteína de mamíferos p53 também é fundamental no controle da divisão celular. Ela tem segmentos estruturados e não estruturados, sendo que segmentos distintos interagem com dúzias de outras proteínas. Uma região não estruturada da p53 na extremidade carboxila interage com pelo menos quatro parceiros diferentes e fica em uma estrutura distinta em cada complexo (Figura 4-22).

Motivos de proteínas são as bases para a classificação da estrutura

Até o momento, mais de 100 mil estruturas de proteína estão arquivadas no Protein Data Bank (PDB). Esses dados têm uma enorme quantidade de informação sobre os princípios que regem a estrutura das proteínas, sobre a função das proteínas e sobre a evolução das proteínas escondidas nesses dados. Felizmente, outros bancos de dados têm essas informações organizadas de forma mais acessível. No Structural Classification of Proteins database, ou SCOP2 (<http://scop2.mrc-lmb.cam.ac.uk>), toda a informação sobre proteínas do PDB pode ser pesquisada de acordo com quatro categorias diferentes: (1) relações entre proteínas, (2) classes de proteínas, (3) tipos de proteínas e (4) eventos evolutivos. A primeira categoria tem várias opções: as proteínas podem ser procuradas com base em características estruturais, relações evolutivas ou “outras” (uma tentativa recente de definir os motivos e subenovelamentos mais comuns). A segunda opção organiza todas as estruturas do PDB de acordo com os elementos da estrutura secundária: **toda α** , **toda β** , **α/β** (com segmentos α e β intercalados ou alternados) e **$\alpha + \beta$** (com regiões α e β segregadas de alguma forma). A terceira categoria organiza as estruturas das

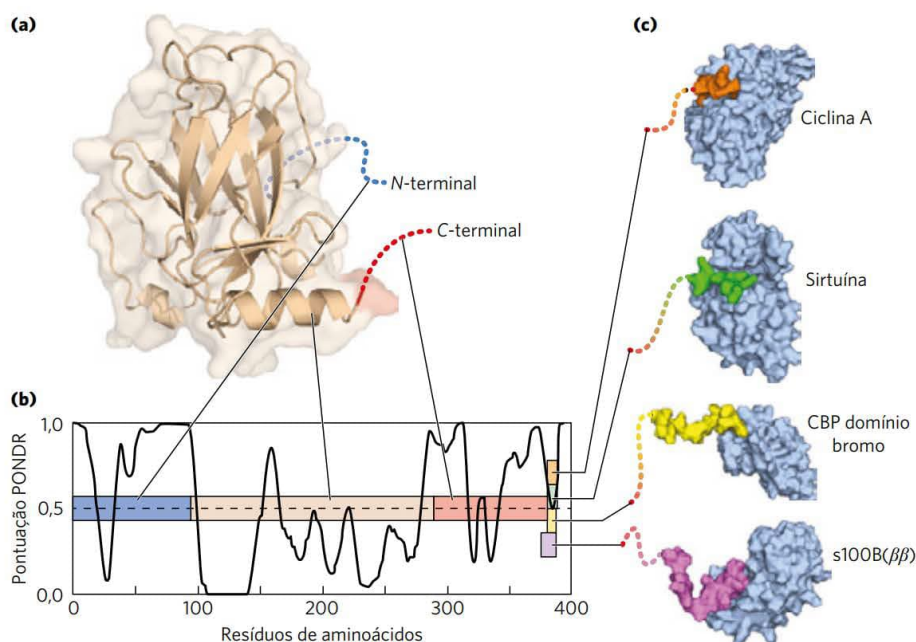


FIGURA 4-22 Ligação da região carboxiterminal intrinsecamente desordenada da proteína p53 com seus ligantes. (a) A proteína p53 é composta de vários segmentos diferentes. Apenas o domínio central é bem organizado. (b) A sequência linear da proteína p53 está representada na forma de barra colorida. O gráfico sobreposto apresenta um diagrama da pontuação PONDR (*Predictor of Natural Disordered Regions*, Previsão de Regiões Naturalmente Desordenadas) versus a sequência da proteína. PONDR é um dos melhores algoritmos disponíveis para prever a probabilidade de um determinado resíduo de aminoácido estar em uma região de desordem intrínseca, com base na sequência de aminoácidos ao redor e na composição de aminoácidos. Uma pontuação de 1,0 indica uma probabilidade de 100% de que a proteína está desordenada. Nesta estrutura proteica, o domínio central em bege está organizado. As regiões aminoterminais (em azul) e carboxiterminais (em vermelho) estão desordenadas. A extremidade da região carboxiterminal pode se ligar a muitas moléculas, e ela se contorce quando se liga a cada uma delas. No entanto, a estrutura tridimensional resultante da ligação é diferente para cada uma das interações mostradas e, por isso, o segmento carboxiterminal (resíduos de 11 a 20) está mostrado em cor diferente em cada complexo. [Fontes: informações de V. N. Uversky, *Intl. J. Biochem. Cell Biol.* 43:1090, 2011, Fig. 5. (a) Obtida de PDB ID 1TUP, Y. Cho et al., *Science* 265:346, 1994. (c) Ciclina A: PDB ID 1H26, E. D. Lowe et al., *Biochemistry* 41:15,625, 2002; sirtuína: PDB ID 1MA3, J. L. Avalos et al., *Mol. Cell* 10:523, 2002; CBP domínio de bromo: PDB ID 1JSP, S. Mujtaba et al., *Mol. Cell* 13:251, 2004; s100B(ββ): PDB ID 1DT7, R. R. Rustandi et al., *Nature Struct. Biol.* 7:570, 2000.]

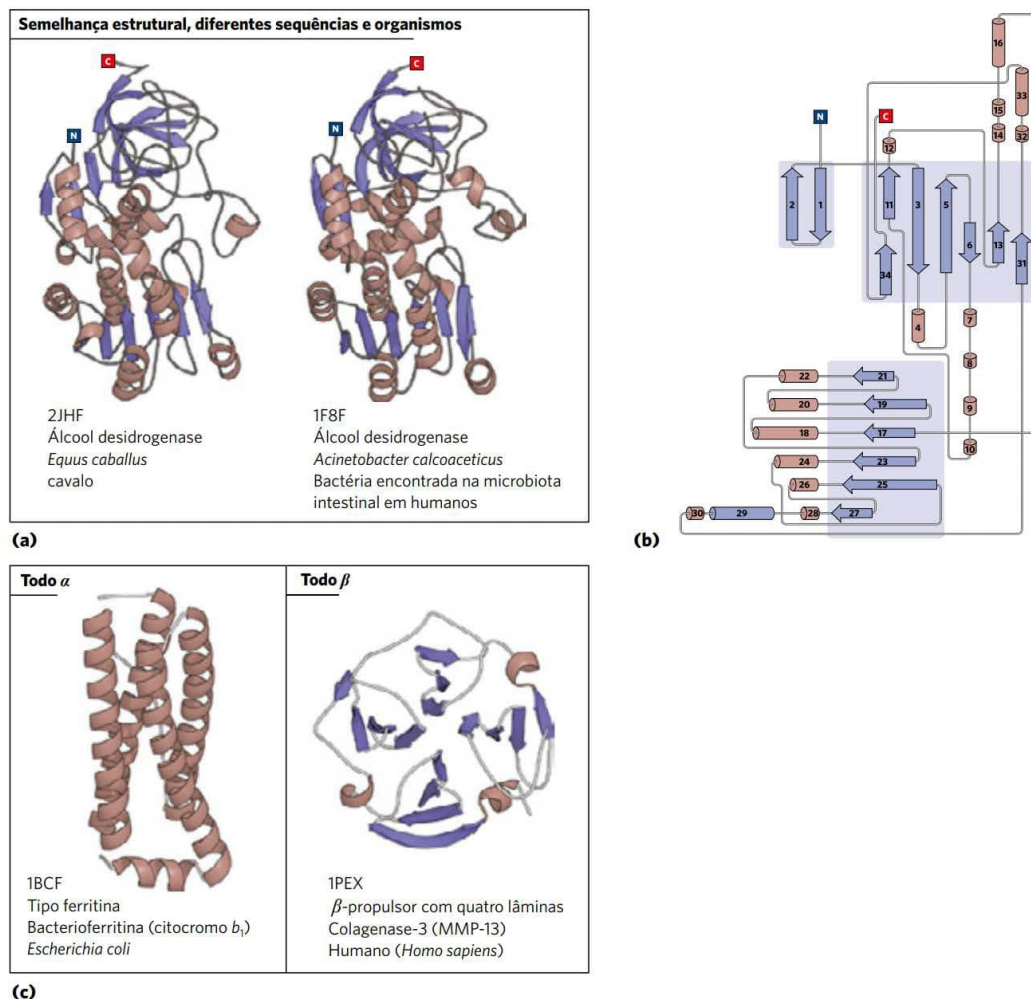


FIGURA 4-23 Organização das proteínas com base em motivos. Alguns das centenas de domínios estáveis conhecidos. **(a)** Diagramas estruturais da enzima álcool-desidrogenase. Comparações desse tipo ilustram as relações evolutivas que levaram a que a estrutura e a função se mantivessem conservadas ao longo da evolução. **(b)** Diagrama de topologia da álcool-desidrogenase de *Acinetobacter calcoaceticus*. Os diagramas de topologia possibilitam uma maneira de visualizar elementos da estrutura secundária e suas interconexões em duas dimensões e podem ser muito úteis para comparar enovelamentos e motivos estruturais. **(c)** O banco de dados Structural Classification of Proteins (SCOP2) (<http://scop2.mrc-lmb.cam.ac.uk>) organiza o enovelamento das proteínas em quatro casses: todo α , todo β , α/β e $\alpha + \beta$. Estão mostrados exemplos de enovelamento todo α e todo β junto com os dados de classificação estrutural (identificador PDB, nome do enovelamento, nome da proteína e organismo de origem), obtido da base de dados SCOP2. O identificador no PDB corresponde ao código único de acesso de cada estrutura depositada no Protein Data Bank (www.rcsb.org). [Fontes: (a) PDB ID 2JHF, R. Meijers et al., *Biochemistry* 46:5446, 2007; PDB ID 1F8F, J. C. Beauchamp et al. (c) PDB ID 1BCF, F. Frolow et al., *Nature Struct. Biol.* 1:453, 1994; PDB ID 1PEX, F. X. Gomis-Ruth et al., *J. Mol. Biol.* 264:556, 1996.]

proteínas segundo o tipo da proteína, como solúvel (globular), proteína de membrana, proteína fibrosa e proteínas intrinsecamente desestruturadas. A última categoria procura por rearranjos estruturais e características incomuns que possam estar relacionadas do ponto de vista da evolução. A **Figura 4-23** mostra exemplos de motivos de proteínas obtidos do SCOP2 que ilustram o potencial para procurar dentro de cada categoria. A figura também apresenta uma outra maneira de representar os elementos de estrutura secundária e as relações entre segmentos da estrutura secundária de uma proteína – o **diagrama de topologia**.

Entretanto, o número de padrões de enovelamento não é infinito. Entre as mais de 80 mil diferentes estruturas de

proteínas arquivadas no PDB, identifica-se apenas cerca de 1.200 enovelamentos ou motivos diferentes. Devido ao número de anos de desenvolvimento da biologia estrutural já é raro descobrir um motivo estrutural novo. Vários exemplos de domínios recorrentes ou motivos estruturais são conhecidos. Esses exemplos revelam que a estrutura terciária das proteínas é mais conservada do que suas seqüências de aminoácidos. A comparação entre as estruturas de proteínas pode, então, fornecer muita informação sobre como foi o caminho da evolução. Proteínas com significativa semelhança na estrutura primária e/ou com estrutura terciária e funções semelhantes fazem parte de uma mesma **família de proteínas**. As estruturas de pro-

teínas do PDB estão distribuídas em cerca de 4 mil famílias de proteínas. Uma relação evolutiva forte normalmente é evidente em uma família de proteínas. Por exemplo, a família globina tem muitas proteínas diferentes com similaridade estrutural e de sequência com a mioglobina (como visto nas proteínas usadas como exemplos no Quadro 4-5 e no Capítulo 5). Algumas vezes, duas ou mais famílias com pouca similaridade na sequência de aminoácidos utilizam o mesmo motivo estrutural geral e apresentam semelhanças funcionais; essas famílias são agrupadas como **superfamílias**. Uma relação evolutiva entre as famílias de uma superfamília é considerada provável, ainda que as diferenças temporais e funcionais – resultantes de diferentes pressões adaptativas – possam ter suprimido muitas das relações entre sequências que poderiam ajudar a rastrear a história evolutiva.

Uma família de proteínas pode estar distribuída em todos os três domínios de vida celular: *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya*, sugerindo uma origem remota. Muitas proteínas envolvidas no metabolismo intermediário e no metabolismo dos ácidos nucleicos e das proteínas se encaixam nessa categoria. Outras famílias podem estar presentes somente em um pequeno grupo de organismos, indicando que aquela estrutura surgiu mais recentemente. Rastrear a história natural dos motivos estruturais, usando as classificações estruturais de bancos de dados como o SCOP, complementa enormemente as análises de sequência na investigação das relações evolutivas. O banco de dados SCOP é gerenciado manualmente, com o objetivo de garantir que as proteínas sejam colocadas na sua rede evolutiva correta, com base nas características estruturais conservadas.

Motivos estruturais tornaram-se especialmente importantes na definição de famílias e superfamílias de proteínas. Sistemas aperfeiçoados de classificação e elucidação de proteínas inevitavelmente levaram à elucidação de novas relações funcionais. Dada a importância das proteínas nos sistemas vivos, essas comparações entre estruturas podem ajudar no esclarecimento de todos os aspectos da bioquímica, desde a evolução de proteínas individualmente até a história evolutiva de vias metabólicas completas.

A estrutura quaternária varia de dímeros simples a grandes complexos

Muitas proteínas têm muitas subunidades polipeptídicas (de duas a centenas). A associação entre cadeias polipeptídicas pode servir a uma grande diversidade de funções. Muitas dessas proteínas formadas por várias subunidades podem ter funções reguladoras. A ligação de pequenas moléculas pode afetar a interação entre as subunidades, causando grandes mudanças na atividade da proteína em resposta a pequenas mudanças na concentração de substratos ou de moléculas reguladoras (Capítulo 6). Em outros casos, subunidades distintas assumem funções diferentes, mas interconectadas, como catálise e regulação. Algumas associações têm funções estruturais, como é o caso das proteínas fibrosas consideradas anteriormente neste capítulo e nas proteínas dos capsídeos dos vírus. Algumas dessas estruturas muito grandes formam sítios de reações complexas envolvendo muitas etapas. Por

exemplo, cada ribossomo, o local onde ocorre a síntese proteica, incorpora dúzias de subunidades de proteínas com moléculas de RNA.

Uma proteína com várias subunidades também é chamada de **multímero**. Um multímero com apenas algumas subunidades é chamado de **oligômero**. Se um multímero possui subunidades que não sejam idênticas, a estrutura total da proteína pode ser assimétrica e bem complicada. Entretanto, a maioria dos multímeros têm subunidades idênticas, ou grupos de subunidades não idênticas que se repetem, geralmente em arranjos simétricos. Como foi discutido no Capítulo 3, as unidades estruturais de repetição em uma proteína multimérica, tanto de um único tipo de subunidade quanto de um grupo de subunidades, são chamadas de **protômeros**.

A primeira proteína oligomérica que teve sua estrutura tridimensional determinada foi a hemoglobina (M_r 64.500). Ela tem quatro cadeias polipeptídicas e quatro grupos prostéticos heme, nos quais os átomos de ferro estão no estado ferroso (Fe^{2+}) (Figura 4-17). A porção proteica da globina consiste em duas cadeias α (141 resíduos de aminoácidos cada uma) e duas cadeias β (146 resíduos cada uma). Observe que, neste caso, α e β não se referem a estruturas secundárias. Na prática, para quem está começando a estudar proteínas isso pode ser confuso. As letras gregas α e β (e γ , δ e outras) geralmente são usadas para diferenciar dois tipos diferentes de subunidades em proteínas com várias subunidades, independentemente de qual tipo de estrutura secundária predomina nas subunidades. Como a hemoglobina é quatro vezes maior do que a mioglobina, foi necessário muito mais tempo e esforço para determinar a sua estrutura tridimensional por análise de raios X, o que foi finalmente obtido por Max Perutz, John Kendrew e colaboradores, em 1959. As subunidades da hemoglobina estão organizadas em pares simétricos (Figura 4-24) de modo que cada par tem uma subunidade α e uma subunidade β . A hemoglobina pode, portanto, ser descrita tanto como tetrâmero quanto como um dímero de protômeros $\alpha\beta$. O papel dessas subunidades distintas na função da hemoglobina está discutido amplamente no Capítulo 5.



Max Perutz, 1914-2002 (à esquerda), e John Kendrew, 1917-1997 [Fonte: Corbis/Hulton Deutsch Collection.]

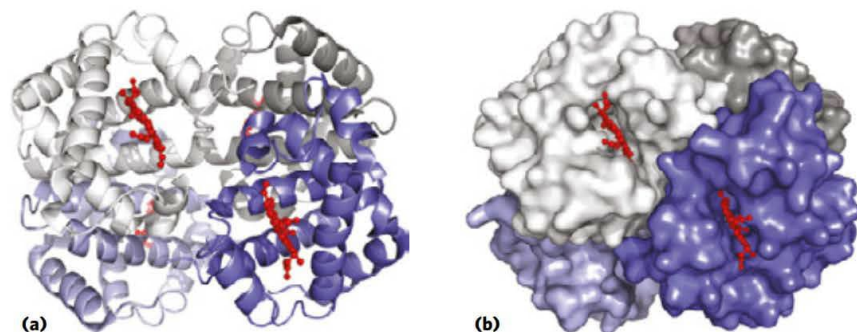


FIGURA 4-24 Estrutura quaternária da desoxi-hemoglobina. Análise da desoxihemoglobina (hemoglobina sem as moléculas de oxigênio ligadas aos grupos heme) por difração de raios X, mostrando como as quatro subunidades peptídicas se associam. **(a)** Representação em fita mostrando os elementos de estrutura secundária e o posicionamento dos quatro grupos prostéticos heme. **(b)** Modelo de superfície de contorno, mostrando os quatro bolsões onde os grupos prostéticos heme se ligam. Essa representação da estrutura ajuda a visualizar como as subunidades se associam. As subunidades α estão sombreadas em cinza, as subunidades β , em azul. Observe que os grupos heme (em vermelho) estão relativamente distantes entre si. [Fonte: PDB ID 2HHB, G. Fermi et al., *J. Mol. Biol.* 175:159, 1984.]

RESUMO 4.3 Estruturas terciária e quaternária das proteínas

- A estrutura terciária é a estrutura tridimensional da cadeia polipeptídica. Muitas proteínas se encaixam em uma dessas duas classes gerais de proteínas, de acordo com a respectiva estrutura terciária: fibrosa ou globular.
- As proteínas fibrosas, utilizadas principalmente para funções estruturais, são formadas por elementos de estrutura secundária que se repetem.
- As proteínas globulares têm estruturas terciárias mais complicadas, geralmente possuindo vários tipos de estruturas secundárias na mesma cadeia polipeptídica. A estrutura da mioglobina foi a primeira estrutura de proteína globular que foi determinada e, para isso, foram usados métodos de difração de raios X.
- As estruturas complexas das proteínas globulares podem ser analisadas pela observação dos padrões de enovelamento, chamados de motivos (também chamados de enovelamentos ou estruturas supersecundárias). As milhares de estruturas proteicas conhecidas geralmente são formadas por um repertório de apenas poucas centenas de motivos. Os domínios são regiões de uma cadeia polipeptídica que podem se enovelar de forma estável e independente.
- Algumas proteínas, ou segmentos de proteínas, são intrinsecamente desordenados e não têm uma estrutura tridimensional definível. Essas proteínas têm composições peculiares de aminoácidos que permitem a formação de uma estrutura mais flexível. Algumas dessas proteínas desordenadas funcionam como componentes estruturais ou sequestradoras; outras podem interagir com muitas proteínas parceiras, servindo como inibidores versáteis ou como componentes centrais de redes de interação entre proteínas. A estrutura quaternária é o resultado de interações entre as subunidades de proteínas com várias subunidades (multiméricas) ou grandes associados de proteínas. Algumas proteínas multiméricas possuem unidades repetidas, formadas por uma única subunidade ou grupos de subunidades, cada unidade chamada de protômero.

4.4 Desnaturação e enovelamento das proteínas

As proteínas têm uma existência surpreendentemente precária. Como foi visto, a conformação de uma proteína nativa é apenas marginalmente estável. Além disso, a maioria das proteínas deve manter certa flexibilidade conformacional para funcionar. A manutenção permanente de um conjunto de proteínas necessárias para a célula em um determinado conjunto de condições é chamada de **proteostase**. A proteostase celular necessita do funcionamento coordenado das vias de síntese e enovelamento de proteínas, do enovelamento de proteínas parcialmente desenoveladas e do sequestro e da degradação de proteínas que ficaram desenoveladas irreversivelmente e já não são mais úteis. Em todas as células, essas redes envolvem centenas de enzimas e proteínas especializadas.

Como visto na **Figura 4-25**, a vida de uma proteína envolve muito mais do que a síntese e a degradação. A estabilidade marginal da maioria das proteínas pode levar a um balanço tênue entre os estados enovelado e desenovelado. À medida que as proteínas são sintetizadas nos ribossomos (Capítulo 27), elas devem se enovelar em suas respectivas conformações nativas. Algumas vezes, isso ocorre espontaneamente, porém, com uma frequência muito maior, há necessidade da ajuda especializada de enzimas e complexos denominados chaperonas. Muitos desses mesmos auxiliares do enovelamento atuam para enovelar novamente proteínas que se tornaram transitariamente desenoveladas. As proteínas mal enoveladas, em geral, expõem superfícies hidrofóbicas que as tornam “pegajosas”, conduzindo à formação de agregados inativos. Essas agregações podem levar à perda de funções normais, mas não são inertes, pois o acúmulo nas células é o ponto central de doenças que vão de diabetes à doença de Parkinson e à doença de Alzheimer. Não é de surpreender que todas as células têm vias sofisticadas de reciclagem e/ou degradação de proteínas irreversivelmente deformadas.

Agora, serão abordadas as transições entre os estados enovelado e desenovelado e a rede de vias que controlam essas transições.

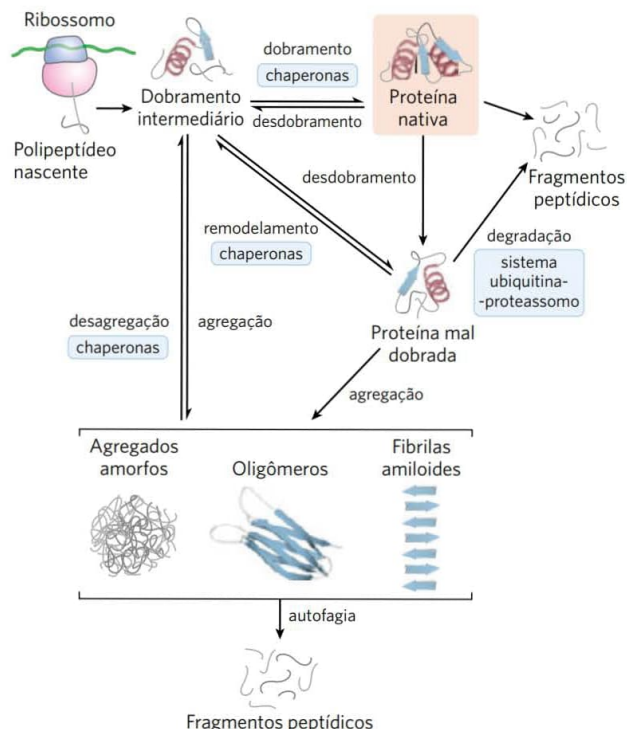
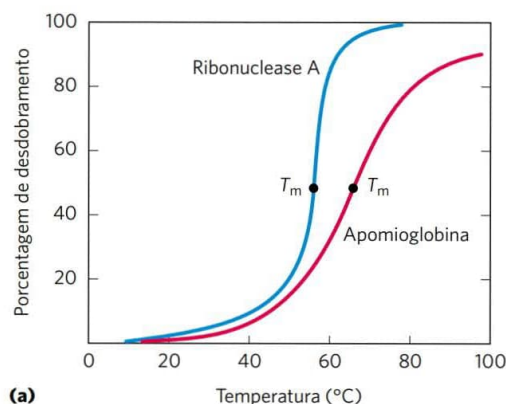


FIGURA 4-25 Vias que contribuem para a proteostase. Três tipos de processos contribuem para a proteostase. Primeiro, as proteínas são sintetizadas no ribossomo. Segundo, várias vias contribuem para o enovelamento proteico, muitas delas envolvem a atividade de complexos chamados de chaperonas. As chaperonas (incluindo as chaperoninas) também contribuem para o reenovelamento de proteínas parcial ou transitoriamente desenoveladas. Por fim, proteínas irreversivelmente desenoveladas estão sujeitas ao sequestro e à degradação por várias vias adicionais. As proteínas desenoveladas e os intermediários proteicos enovelados que escapam do controle de qualidade das chaperonas e das vias de degradação podem se agregar, formando tanto agregados desordenados quanto agregados organizados do tipo amiloide, que contribuem para algumas doenças e para os processos de envelhecimento. [Fonte: informações de F. U. Hartl et al., *Nature* 475:324, 2011, Fig. 6.]

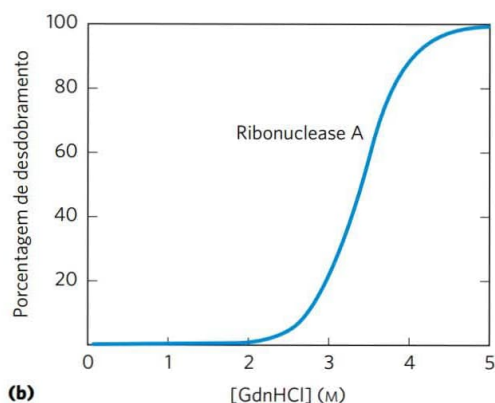
A perda de estrutura da proteína determina a perda da função

As estruturas proteicas evoluíram para atuar em determinados ambientes celulares. Condições diferentes daquelas da célula podem levar a mudanças estruturais, grandes ou pequenas, na proteína. Uma perda na estrutura tridimensional que seja suficiente para causar a perda de função é chamada de **desnaturação**. O estado desnaturado não necessariamente corresponde ao desdobramento completo da proteína e à randomização da conformação. Na maioria das condições, as proteínas desnaturadas existem como um conjunto de estados parcialmente enovelados.

A maioria das proteínas pode ser desnaturada pelo calor, que tem efeitos complexos nas muitas interações fracas da proteína (principalmente sobre as ligações de hidrogênio). Se a temperatura é aumentada lentamente, a conformação da proteína, em geral, permanece intacta até que, em uma estreita faixa de temperatura, ocorre uma perda abrupta da



(a)



(b)

FIGURA 4-26 Desnaturação de proteínas. Os resultados correspondem a proteínas desnaturadas por duas modificações diferentes no ambiente. Em cada caso, a transição entre o estado enovelado e o estado não enovelado é abrupta, sugerindo que o processo de desenovelamento é cooperativo. **(a)** Desnaturação térmica da apomioglobina (mioglobina sem o grupo prostético heme) de cavalo e da ribonuclease A (com as ligações dissulfeto intactas; ver Figura 4-27). O ponto médio da faixa de temperatura em que ocorre a desnaturação é chamado de temperatura de fusão, ou T_m . A desnaturação da apomioglobina foi monitorada por dicroísmo circular (ver Figura 4-10), que mede a quantidade de estrutura helicoidal na proteína. A desnaturação da ribonuclease A foi monitorada acompanhando-se as mudanças na fluorescência intrínseca da proteína, que é afetada pelas mudanças no ambiente ao redor do resíduo de Trp (introduzido por mutação). **(b)** Desnaturação da ribonuclease A (com as ligações dissulfeto intactas) por hidrocloreto de guanidina (GdnHCl), monitorado por dicroísmo circular. [Fontes: (a) dados obtidos de R. A. Sendak et al., *Biochemistry* 35:12,978, 1996; I. Nishii et al., *J. Mol. Biol.* 250:223, 1995. (b) Dados obtidos de W. A. Houry et al., *Biochemistry* 35:10,125, 1996.]

estrutura (e da função) (**Figura 4-26**). A mudança repentina é um indicio de que o desenovelamento é um processo cooperativo: a perda de estrutura em uma parte da proteína desestabiliza as outras partes. Os efeitos do calor sobre as proteínas podem ser abrandados pela estrutura. As proteínas altamente termorresistentes de bactérias termofílicas e de arqueobactérias evoluíram para funcionar na temperatura das fontes hidrotermais ($\sim 100^\circ\text{C}$). As estruturas enoveladas dessas proteínas, em geral, são semelhantes às de outros organismos, mas alguns dos princípios resumidos aqui são levados a extremos. Elas geralmente se caracterizam por uma alta densidade de resíduos carregados na

superfície, mesmo tendo um interior hidrofóbico altamente compacto, e o enovelamento fica menos flexível devido à formação de uma rede de pares iônicos. Isso faz essas proteínas serem menos suscetíveis ao desenovelamento em altas temperaturas.

As proteínas também podem ser desnaturadas por pH extremos, por certos solventes orgânicos miscíveis, como álcool ou acetona, por certos solutos, como ureia e hidrócloro de guanidina, ou por detergentes. Cada um desses agentes desnaturantes representa um tratamento relativamente brando, já que nenhuma ligação covalente da cadeia polipeptídica é rompida. Solventes orgânicos, ureia e detergentes agem principalmente perturbando a agregação hidrofóbica das cadeias laterais de aminoácidos apolares que estabiliza o núcleo globular das proteínas. A ureia também desfaz ligações de hidrogênio, e extremos de pH alteram a carga líquida das proteínas, provocando repulsão eletrostática e desfazendo ligações de hidrogênio. As estruturas desnaturadas resultantes desses vários tratamentos não são, necessariamente, as mesmas.

A desnaturação geralmente leva à precipitação da proteína, uma consequência da formação de agregados proteicos pela exposição de superfícies hidrofóbicas que então se associam. Os agregados são, com frequência, altamente desordenados. O precipitado proteico visto após ferver um ovo é um exemplo. Agregados mais ordenados também são observados em algumas proteínas, como será discutido a seguir.

A sequência de aminoácidos determina a estrutura terciária

A estrutura terciária de uma proteína globular é determinada pela sua sequência de aminoácidos. A prova mais importante disso vem de experimentos que mostram que a desnaturação de algumas proteínas é reversível. Certas proteínas globulares desnaturadas por temperatura, extremos de pH ou agentes desnaturantes reassumem suas estruturas nativas e suas atividades biológicas se forem colocadas novamente nas condições nas quais a conformação nativa é estável. Esse processo é chamado de **renaturação**.

Um exemplo clássico é a desnaturação e a renaturação da ribonuclease A, demonstradas por Christian Anfinsen na década de 1950. A ribonuclease A pura desnatura completamente em uma solução concentrada de ureia, na presença de um agente redutor. O agente redutor rompe as quatro ligações dissulfeto, resultando em oito resíduos Cys, e a ureia rompe as interações hidrofóbicas de estabilização, de modo que todo o polipeptídeo perde a sua conformação enovelada. A desnaturação da ribonuclease é acompanhada pela perda total da atividade catalítica. Quando a ureia e o agente redutor são removidos, a ribonuclease desnaturada, enovelada aleatoriamente, enovela-se de modo espontâneo, formando a estrutura terciária correta, com restauração total da atividade catalítica (**Figura 4-27**). O reenovelamento da ribonuclease é tão preciso que as quatro ligações dissulfeto intramoleculares são restabelecidas na molécula renaturada nas mesmas posições da ribonuclease nativa. Posteriormente, resultados semelhantes foram obtidos utilizando uma ribonuclease A cataliticamente ativa que foi sintetizada quimicamente. Isso eliminou a possibilidade de que a presença de algum contaminante residual na preparação da ri-

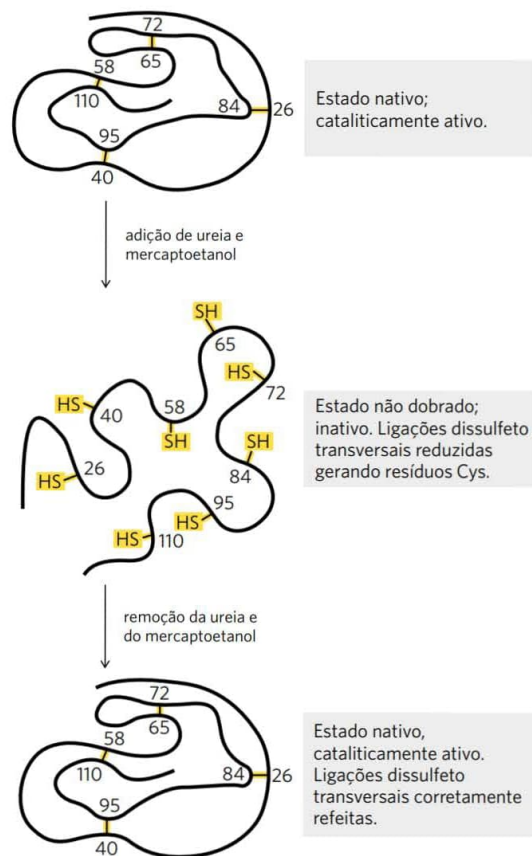


FIGURA 4-27 Renaturação da ribonuclease desnaturada e desenovelada. A ureia desnatura a ribonuclease, e o mercaptoetanol ($\text{HO-CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$) a reduz, rompendo as ligações dissulfeto e liberando os oito resíduos Cys. A renaturação envolve o restabelecimento correto das ligações dissulfeto transversais.

bonuclease purificada por Anfinsen tenha contribuído para a renaturação da enzima, afastando, assim, qualquer dúvida de que ainda pudesse restar de que essa enzima se enovela espontaneamente.

O experimento de Anfinsen deu a primeira evidência de que a sequência de aminoácidos de uma cadeia polipeptídica contém todas as informações necessárias para o enovelamento da cadeia na sua estrutura tridimensional nativa. Trabalhos posteriores demonstraram que somente uma minoria de proteínas, muitas delas pequenas e estáveis por natureza, enovela-se espontaneamente na forma nativa. Apesar de todas as proteínas terem o potencial de se enovelar formando a estrutura nativa, muitas delas necessitam de algum tipo de ajuda.

Os polipeptídeos enovelam-se rapidamente por um processo gradual

Nas células, as proteínas são construídas a partir dos aminoácidos em uma velocidade muito alta. Por exemplo, células de *E. coli* podem fazer uma molécula de proteína, biologicamente ativa, contendo 100 resíduos de aminoácidos em cerca de 5 segundos a 37°C . Entretanto, a síntese de ligações peptídicas nos ribossomos não é suficiente: a proteína deve ser enovelada corretamente.

Como a cadeia polipeptídica chega à sua conformação nativa? Suponha, de forma conservadora, que cada um dos resíduos de aminoácidos pode assumir, em média, 10 conformações diferentes, resultando em 10^{100} conformações diferentes do polipeptídeo. Suponha, também, que a proteína se enovela espontaneamente por um processo aleatório no qual ela testa todas as conformações possíveis em torno de cada uma das ligações de seu esqueleto até encontrar a forma nativa, biologicamente ativa. Se cada conformação fosse testada no menor tempo possível ($\sim 10^{-13}$ segundos, isso é o tempo necessário para uma única vibração molecular), seria preciso, aproximadamente, 10^{77} anos para testar todas as conformações possíveis. Obviamente, o enovelamento de proteínas não pode ser um processo completamente aleatório de tentativa e erro. Deve haver atalhos. Esse problema foi apontado pela primeira vez por Cyrus Levinthal, em 1968, sendo algumas vezes chamado de paradoxo de Levinthal.

A via de enovelamento de uma cadeia polipeptídica grande é muito complicada. No entanto, o progresso tem sido rápido nesse campo, o suficiente para chegar a algoritmos robustos que geralmente podem prever a estrutura de proteínas menores com base nas sequências de aminoácidos. As principais vias de enovelamento são hierárquicas. As estruturas secundárias locais formam-se primeiro. Sequências de aminoácidos enovelam-se facilmente em α -hélice ou folhas β devido às restrições como aquelas que foram examinadas na discussão sobre estrutura secundária. Interações iônicas, envolvendo grupos carregados que normalmente estão próximos na sequência linear da cadeia polipeptídica, podem ter um papel importante no direcionamento dos primeiros passos de enovelamento. O arranjo de estruturas locais é seguido por interações de longo alcance entre, por exemplo, elementos da estrutura secundária que se aproximam para formar estruturas enoveladas estáveis. As interações hidrofóbicas exercem um papel significativo ao longo do processo, já que a agregação das cadeias laterais de aminoácidos apolares fornece uma estabilização entrópica a intermediários e, por fim, à estrutura enovelada final. O processo continua até a formação de domínios completos e que todo o polipeptídeo esteja enovelado (**Figura 4-28**). Proteínas nas quais predominam interações de curto alcance (entre pares de resíduos geralmente localizados próximos um do outro na sequência polipeptídica) tendem a se enovelar mais rapidamente do que proteínas com padrões de enovelamento mais complexos e com mais interações de longo alcance entre os diferentes segmentos. À medida que as proteínas com vários domínios são sintetizadas, domínios próximos à extremidade aminoterminal (sintetizados primeiro) podem se enovelar antes que o polipeptídeo inteiro esteja pronto.

Termodinamicamente, o processo de enovelamento pode ser visto como um tipo de funil de energia livre (**Figura 4-29**). Os estados não enovelados são caracterizados por um alto grau de entropia conformacional e energia livre relativamente alta. À medida que o enovelamento progride e a proteína se aproxima do estado nativo, o estreitamento do funil reflete a diminuição do espaço conformacional que deve ser procurado. As pequenas depressões ao longo das paredes do funil de energia livre representam intermediários semiestáveis, que podem tornar o processo de enovelamento um pouco mais lento. No fundo do funil,

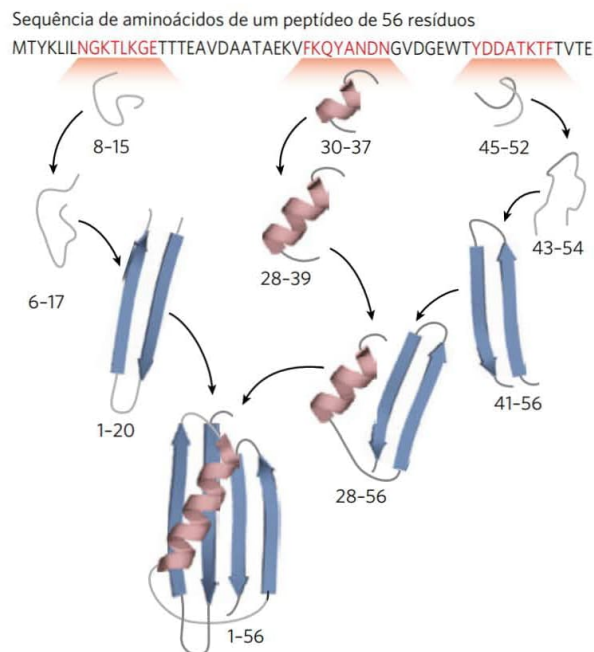


FIGURA 4-28 Uma via de enovelamento proteico para uma proteína pequena. Via hierárquica obtida por modelagem computacional. Primeiro, pequenas regiões de estrutura secundária são agrupadas e, então, gradualmente incorporadas em estruturas maiores. O programa usado para este modelo tem tido muito sucesso na predição da estrutura tridimensional de proteínas pequenas a partir da sequência de aminoácidos. Os números indicam as posições dos resíduos de aminoácido do peptídeo de 56 resíduos que atingiram a estrutura final em cada uma das etapas indicadas. [Fonte: informações de K. A. Dill et al., *Annu. Rev. Biophys.* 37:289, 2008, Fig. 5.]

o conjunto de intermediários enovelados é reduzido a uma única conformação nativa (ou a um pequeno conjunto de conformações nativas). Os funis podem ter muitas formas diferentes, dependendo da complexidade da via de enovelamento, da existência de intermediários semiestáveis e do potencial de determinados intermediários de se reunirem em agregados de proteínas enoveladas erroneamente (**Figura 4-29**).

A estabilidade termodinâmica não está igualmente distribuída ao longo da estrutura da proteína – a molécula tem regiões de relativamente alta estabilidade e outras de estabilidade baixa ou desprezível. Por exemplo, uma proteína pode ter dois domínios estáveis ligados por um segmento inteiramente desordenado. Regiões de menor estabilidade podem permitir que a proteína altere sua conformação entre dois ou mais estados. Como será visto nos próximos dois capítulos, variações na estabilidade de determinadas regiões de uma proteína são, com frequência, essenciais para a função da proteína. Proteínas ou segmentos proteicos intrinsecamente desordenados não se enovelam.

À medida que o conhecimento sobre estrutura e enovelamento de proteínas evolui, novos programas de computador, cada vez mais sofisticados, são desenvolvidos, visando prever a estrutura das proteínas a partir da sequência de aminoácidos. A predição da estrutura tridimensional das proteínas é uma das especialidades da bioinformática, e os progressos nessa área são acompanhados com

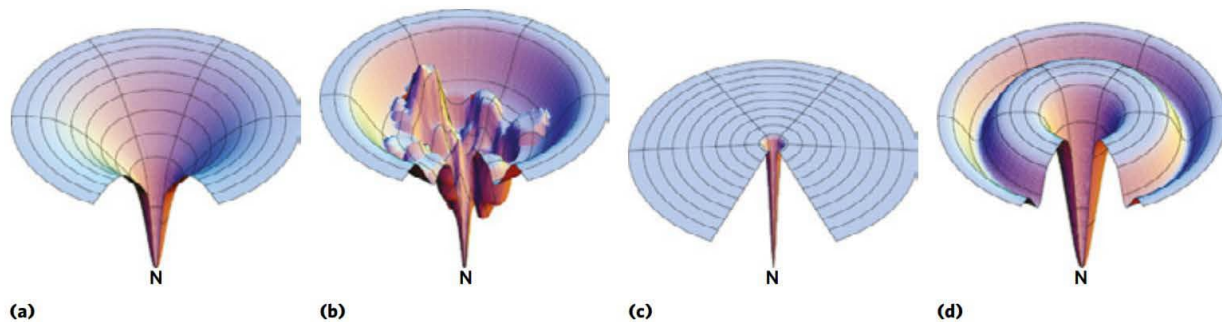


FIGURA 4-29 Termodinâmica do enovelamento proteico, mostrado como funil de energia livre. À medida que as proteínas se enovelam, o espaço conformacional que pode ser explorado pela estrutura fica mais restrito. Modelo tridimensional de um funil termodinâmico, em que ΔG está representado pela profundidade do funil e a estrutura nativa (N) no fundo do funil (ponto de menor energia livre). O funil para determinada proteína pode ter muitas formas, dependendo do número e dos tipos de intermediários de enovelamento nas vias de enovelamento. Qualquer intermediário com estabilidade significativa e um tempo de vida finita pode ser representado como um mínimo de energia-livre local – uma depressão na superfície do funil. **(a)** Um funil simples, mas relativamente amplo e suave é representativo de uma proteína com muitas vias de enovelamento (i.e., a ordem em que as distintas partes da proteína se enovelam seria de alguma forma aleatória), mas que alcança suas estruturas tridimensionais sem intermediários de enovelamento que tenham estabilidade significativa. **(b)** Este funil representa uma proteína mais comum com muitos intermediários de enovelamento possíveis possuindo estabilidade significativa nas várias vias que levam à estrutura nativa. **(c)** Uma proteína com estrutura nativa estável, essencialmente sem intermediários de enovelamento com estabilidade significativa, e com apenas uma ou muito poucas vias de enovelamento produtivo está mostrada como um funil com uma depressão estreita levando à forma nativa. **(d)** Uma proteína com intermediários de enovelamento com estabilidade substancial em praticamente qualquer via que leva ao estado nativo (i.e., uma proteína na qual um motivo ou domínio particular sempre se enovela rapidamente, mas as outras partes da proteína se enovelam mais lentamente e em ordem aleatória) é representada por um funil com uma depressão principal ao redor da depressão que leva à forma nativa. [Fonte: informações de K. A. Dill et al., *Annu. Rev. Biophys.* 37:289, 2008, Fig. 9.]

um teste bianual chamado de competição CASP (Critical Assessment of Structural Prediction, ou Avaliação Crítica da Predição Estrutural). Centenas de grupos de pesquisa do mundo todo são convidados para prever a estrutura de determinada proteína (proteína com estrutura já determinada, mas ainda não divulgada). Os grupos de pesquisa que têm mais sucesso são convidados a apresentar seus resultados na conferência da CASP. Esses esforços em aumentar a predição correta de proteínas pequenas vêm obtendo um sucesso cada vez maior.

Algumas proteínas precisam de ajuda para se enovelarem

Nem todas as proteínas se enovelam espontaneamente à medida que são sintetizadas dentro da célula. O enovelamento de muitas proteínas necessita de **chaperonas**, proteínas que interagem com polipeptídeos parcialmente enovelados ou enovelados de forma incorreta e que facilitam os mecanismos de enovelamento correto ou possibilitam um microambiente adequado para ocorrer o enovelamento. Vários tipos de chaperonas moleculares foram encontrados em organismos, desde bactérias até os seres humanos. As duas principais famílias de chaperonas, ambas bem estudadas, são a família da **Hsp70** e as **chaperoninas**.

A família de proteínas Hsp70 geralmente tem massa molecular próxima de 70.000 e é mais abundante em células submetidas a altas temperaturas (por isso, a denominação “proteínas de choque térmico”, do inglês, *heat shock proteins*, de M_r 70.000, ou Hsp70). As proteínas Hsp70 ligam-se a regiões não enoveladas de peptídeos ricos em resíduos hidrofóbicos. Dessa forma, essas chaperonas “protegem” da desnaturação pela temperatura tanto as moléculas de proteína quanto as novas moléculas de peptídeo que estão sendo sintetizadas (e ainda não estão enoveladas). As proteínas Hsp70 também bloqueiam o enovelamento de certas proteínas que devem permanecer não enoveladas até que

sejam deslocadas através da membrana (como descrito no Capítulo 27). Algumas chaperonas também facilitam o arranjo quaternário de proteínas oligoméricas. As proteínas Hsp70 ligam-se a polipeptídeos e os liberam em um ciclo que utiliza a energia da hidrólise do ATP e envolve diversas outras proteínas (incluindo uma classe chamada de Hsp40). A **Figura 4-30** ilustra um enovelamento ajudado por chaperonas, como o elucidado para as chaperonas Hsp70 e Hsp40 eucarióticas. A ligação de um peptídeo não enovelado à chaperona Hsp70 pode levar à quebra de um agregado proteico ou impedir a formação de um novo agregado. Quando o peptídeo ligado é liberado, ele tem a chance de retomar o enovelamento característico da estrutura nativa. Se o enovelamento não ocorrer rápido o suficiente, o polipeptídeo pode ser ligado de novo, e o processo se repete. De modo alternativo, o polipeptídeo ligado a Hsp70 pode ser entregue a uma chaperonina.

Chaperoninas são complexos sofisticados de proteínas necessários para o enovelamento de proteínas que não se enovelam espontaneamente. Em *E. coli*, estima-se que 10 a 15% das proteínas necessitam do sistema de chaperoninas, chamado de GroEL/GroES, para o enovelamento em condições normais (mais de 30% precisam de ajuda quando as células são submetidas ao estresse por calor). Em eucariotos, o sistema de chaperoninas análogo chama-se Hsp60. As chaperoninas passaram a ser conhecidas quando se percebeu que elas são necessárias para o crescimento de certos vírus bacterianos (por isso, a designação “Gro”, de *growth*). Essas proteínas chaperonas são organizadas como anéis de subunidades e formam duas câmaras orientadas uma de costas para a outra. Uma proteína desenovelada primeiro se liga a uma superfície hidrofóbica exposta próxima à extremidade apical de uma câmara GroEL. A proteína é, então, presa dentro da câmara que é, transitoriamente, fechada pela “tampa” GroES (**Figura 4-31**). A GroEL sofre mu-

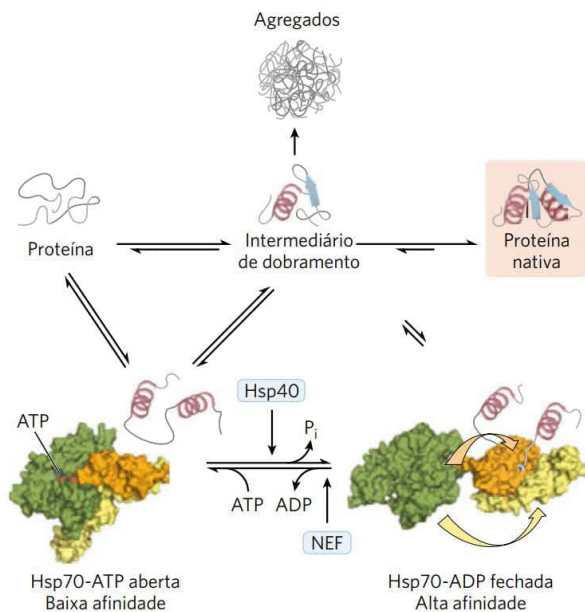


FIGURA 4-30 Chaperonas e enovelamento proteico. A via pela qual as chaperonas da classe Hsp70 se associam e liberam os peptídeos está ilustrada pelas chaperonas Hsp70 e Hsp40 de eucariotos. As chaperonas não são responsáveis diretamente pelo enovelamento da proteína, mas evitam a formação de agregados de peptídeos não enovelados. Uma proteína desenovelada ou uma parte desenovelada de uma proteína inicialmente se liga à forma aberta de Hsp70 (que tem ATP ligado). Então, a Hsp40 interage com esse complexo, ativando a hidrólise de ATP e induzindo o complexo a passar à forma fechada, onde os domínios marcados em cor de laranja e amarelo se aproximam como as duas partes de uma mandíbula, aprisionando no seu interior partes da proteína desenovelada. A dissociação do ADP e a reciclagem da Hsp70 necessita da interação com outra proteína, um fator de troca de nucleotídeo (NEF). Em uma população de moléculas de polipeptídeos, uma parte das moléculas liberadas após a ligação transitória das proteínas enoveladas parcialmente pela Hsp70 assume a conformação nativa. As moléculas remanescentes são novamente ligadas pela Hsp70 ou desviadas para o sistema das chaperoninas (Hsp60; ver Figura 4-31). Em bactérias, as chaperonas Hsp70 e Hsp40 são chamadas DnaK e DnaJ, respectivamente. DnaK e DnaJ foram primeiro identificadas como proteínas necessárias para a replicação *in vitro* de certas moléculas de DNA viral (por isso a designação “Dna”). [Fontes: informações de F. U. Hartl et al., *Nature* 475:324, 2011, Fig. 2. Hsp70-ATP aberta: PDB ID 2QXL, Q. Liu e W. A. Hendrickson, *Cell* 131:106, 2007. Hsp70-ADP fechada: derivada de PDB ID 2KHO, E. B. Bertelson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106:8471, 2009, e PDB ID 1DKZ, X. Zhu et al., *Science* 272:1606, 1996.]

danças conformacionais substanciais, associadas à hidrólise lenta de ATP, que também regula a ligação e a liberação de GroES. Dentro da câmara, uma proteína tem cerca de 10 segundos para se enovelar – o tempo necessário para a hidrólise do ATP que tem ligado. A restrição de uma proteína dentro da câmara evita uma agregação proteica inapropriada e limita o espaço conformacional que a cadeia polipeptídica pode explorar à medida que se enovela. A proteína é liberada quando GroES se dissocia, mas pode religar rapidamente para outro ciclo se o enovelamento não tiver sido completo. As duas câmaras em um complexo GroEL se alternam na ligação e na liberação dos substratos polipeptídicos. Em eucariotos, o sistema Hsp60 utiliza um sistema semelhante para o enovelamento de proteínas. No entanto, em vez da

tampa GroES, protrusões dos domínios apicais das subunidades se flexionam e fecham a câmara. Além disso, o ciclo de hidrólise de ATP é mais lento nos complexos Hsp60 e isso dá mais tempo para que a proteína que está presa na câmara se enovele.

Finalmente, as vias de enovelamento de algumas proteínas precisam ainda de duas enzimas que catalisam reações de isomerização. A **proteína dissulfeto-isomerase (PDI)** é uma enzima amplamente distribuída que catalisa a interconversão, ou modificação, de ligações dissulfeto até que as ligações da conformação nativa sejam formadas. Entre as suas funções, a PDI catalisa a eliminação de intermediários enovelados com ligações dissulfeto transversais inadequadas. O **peptídeo prolil *cis-trans* isomerase (PPI)** catalisa a interconversão entre os isômeros *cis* e *trans* de ligações peptídicas formadas por resíduos de Pro (Figura 4-8) e isso pode ser uma etapa que retarda o enovelamento de proteínas que contenham algumas ligações peptídicas envolvendo Pro na configuração *cis*.

Defeitos no enovelamento proteico constituem a base molecular de uma ampla gama de doenças genéticas humanas



Apesar da existência de muitos processos que auxiliam no enovelamento proteico, podem ocorrer erros. De fato, o enovelamento proteico errado é um problema substancial para as células, sendo que um quarto ou mais de todos os polipeptídeos sintetizados é destruído por não se enovelar corretamente. Em alguns casos, os erros de enovelamento causam ou contribuem para o desenvolvimento de doenças graves.

Muitas condições, incluindo diabetes tipo 2, doença de Alzheimer, doença de Huntington e doença de Parkinson estão associadas com um mecanismo de enovelamento errôneo. Uma proteína solúvel normalmente secretada pela célula passa a ser secretada em um estado de enovelamento errado, sendo convertida em uma fibra **amiloide** extracelular insolúvel. Essas doenças são coletivamente chamadas de **amiloidoses**. As fibras são altamente ordenadas e não ramificadas, com um diâmetro de 7 a 10 nm e alto conteúdo de estruturas do tipo folha β . Os segmentos β têm uma orientação perpendicular ao eixo da fibra. Em algumas fibras amiloides a estrutura geral inclui duas camadas de folhas β , como a mostrada para o peptídeo β -amiloide na **Figura 4-32**.

Muitas proteínas podem assumir a estrutura de fibrila amiloide como alternativa para as conformações enoveladas normais, sendo que a maioria dessas proteínas tem grande concentração de resíduos de aminoácidos aromáticos em uma região central das folhas β ou α -hélice. As proteínas são secretadas em uma conformação não totalmente enovelada. O núcleo central (ou parte dele) dobra-se em uma folha β antes que o resto da proteína se enovele corretamente, e as folhas β de duas ou mais moléculas de proteínas com enovelamento incompleto se associam para começar a formação de uma fibrila amiloide. A fibrila cresce no espaço extracelular. Outras partes da proteína, então, enovelam-se de forma diferente, ficando externas ao núcleo de folhas β da fibrila em formação. O efeito dos aminoácidos aromáticos na estabilização da estrutura está mostrado na Figura 4-32c. A maioria das moléculas de proteína se enovela e, por isso, o surgimento dos sintomas das amiloidoses geralmente é mui-

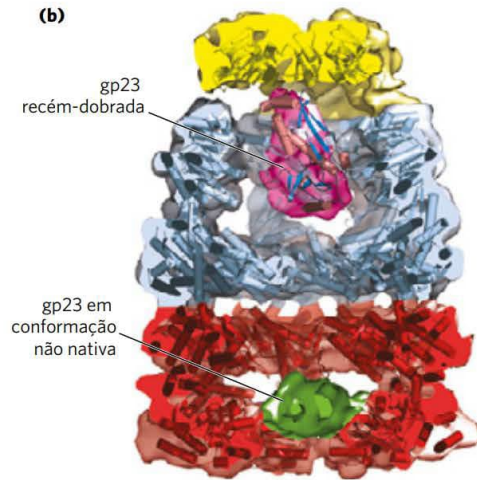
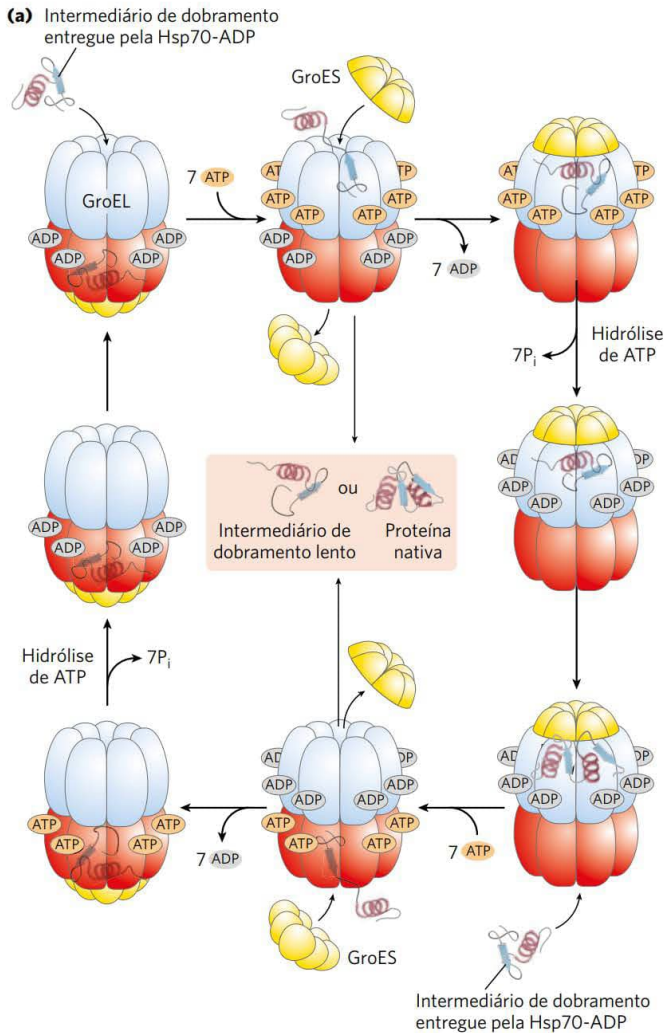


FIGURA 4-31 Chaperoninas e o enovelamento de proteínas.

(a) Mecanismo de ação proposto para as chaperoninas GroEL (membro da família de proteínas Hsp60) e GroES de *E. coli*. Cada complexo GroEL consiste em dois anéis heptaméricos que formam duas câmaras grandes (cada subunidade tem M_r 57.000). A GroES, também um heptâmero (subunidades de M_r 10.000), bloqueia a entrada de uma das câmaras na GroEL depois que uma proteína desenovelada se liga dentro de uma das câmaras. A câmara com a proteína desenovelada é designada *cis* e a câmara oposta é denominada *trans*. O enovelamento ocorre no interior da câmara *cis*, durante o tempo que leva para hidrolisar os 7 ATP ligados às subunidades do anel heptamérico. As moléculas de GroES e de ADP então se dissociam, e a proteína é liberada. As duas câmaras do sistema GroEL/Hsp60 alternam a ligação e facilitam o enovelamento das proteínas-alvo. (b) Imagem de um corte do complexo GroEL/GroES. As estruturas secundárias da α -hélice estão representadas na forma de cilindros com a estrutura da superfície transparente. Vista de uma proteína (gp23) enovelada dentro do grande espaço interior da câmara superior e versão desenovelada da gp23 no interior da câmara inferior. [Fontes: (a) informações de F. U. Hartl et al., *Nature* 475:324, 2011, Fig. 3. (b) Vista da superfície de GroEL/GroES com gp23 desenovelada: EMDB-1548, D. K. Clare et al., *Nature* 457:107, 2009; GroEL/GroES: PDB ID 2CGT, D. K. Clare et al., *J. Mol. Biol.* 358:905, 2006; gp23 enovelada: PDB ID 1YUE, A. Fokine et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:7163, 2005.]

to lento. Os sintomas da doença podem começar mais cedo caso uma pessoa herde uma mutação, como a substituição de um resíduo aromático em uma posição que favorece a formação de fibrilas amiloides.

Nos eucariotos, as proteínas destinadas à secreção iniciam o enovelamento no retículo endoplasmático (RE; ver via no Capítulo 27). Quando ocorrem condições de estresse ou quando a síntese proteica ameaça sobrecarregar a capacidade de enovelamento proteico do RE, pode ocorrer o acúmulo de proteínas desenoveladas. Essas condições disparam a resposta a proteínas não enoveladas (UPR, do inglês, *unfolded protein response*). Um conjunto de reguladores transcricionais que constituem a UPR alinha os vários sistemas por aumentar a concentração de chaperonas no RE ou por diminuir a taxa global de síntese proteica, ou ambos. Os agregados amiloides que se formam antes que a UPR entre em ação podem ser removidos. Alguns são degradados por **autofagia**. Nesse processo, os agregados são primeiro encapsulados em uma membrana e, então, o conteúdo da vesícula resultante é degradado após fusão da

vesícula com um lisossomo citosólico. De modo alternativo, as proteínas erroneamente enoveladas podem ser degradadas por um sistema de proteases, denominado sistema ubiquitina-proteassomo (descrito no Capítulo 27). Defeitos em qualquer um desses sistemas diminuem a capacidade de lidar com proteínas erroneamente enoveladas e aumentam a propensão para o desenvolvimento de doenças amiloides. UPR é uma resposta complexa que envolve vários fatores proteicos e sinais. A inativação de componentes da UPR pode ter efeitos positivos ou negativos na degradação de proteínas mal enoveladas. Esse sistema é um alvo interessante para fármacos visando o tratamento de doenças de enovelamento incorreto de proteínas (amiloide).

Algumas amiloidoses são sistêmicas, envolvendo vários tecidos. A amiloidose sistêmica primária é causada pela deposição de fibrilas formadas por cadeias leves de imunoglobulinas com enovelamento incorreto (ver Capítulo 5), ou fragmentos de cadeias leves originados por degradação proteolítica. A idade média de aparecimento é de 65 anos. Os pacientes têm sintomas como fadiga, rouquidão, inchaço

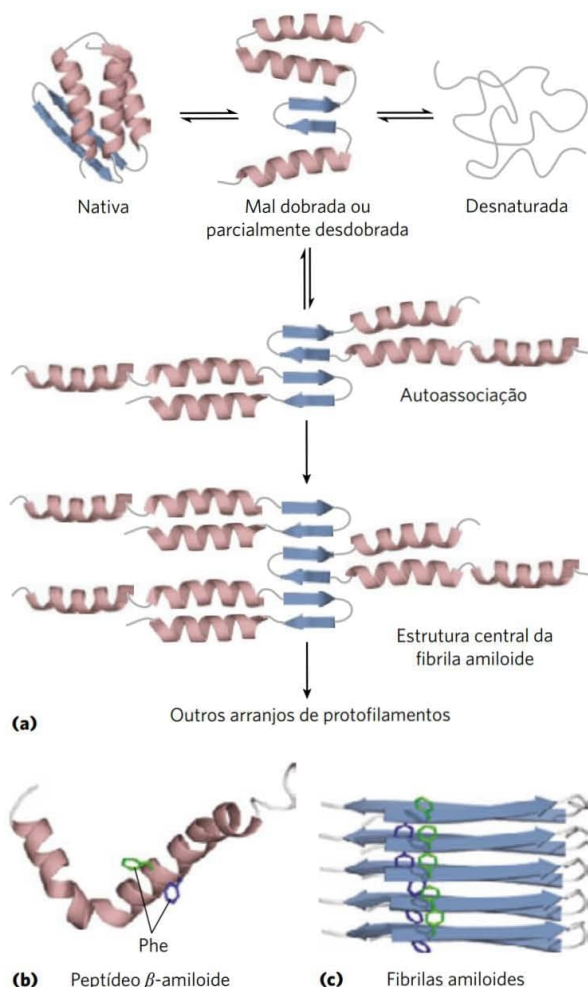


FIGURA 4-32 Formação das fibrilas amiloides causadoras de doenças. (a) Moléculas de proteínas cujas estruturas normais incluem regiões de folha em β sofrem um enovelamento parcial. Em um pequeno número de moléculas, antes do enovelamento completo, as regiões de folhas β de um polipeptídeo se associam com a mesma região de outro polipeptídeo, formando o núcleo de um amiloide. Outras moléculas de proteína lentamente se associam ao amiloide e o estendem, formando uma fibrila. (b) O peptídeo β -amiloide inicia com dois segmentos α -hélice de uma proteína maior. A clivagem proteolítica dessa proteína grande deixa o peptídeo β -amiloide relativamente instável, o que leva à perda da estrutura em α -hélice. O peptídeo pode, então, lentamente se organizar em fibrilas amiloides (c), que contribuem para as placas características no espaço extracelular do tecido nervoso das pessoas com doença de Alzheimer. As cadeias laterais aromáticas mostradas exercem um papel significativo na estabilização da estrutura amiloide. O amiloide é rico em fitas β , e os segmentos em β se organizam perpendicularmente ao eixo da fibrila amiloide. O peptídeo β -amiloide toma a forma de duas camadas de folhas β estendidas paralelas. Alguns peptídeos que formam amiloide podem se enovelar, formando β -hélices. [Fontes: (a) informações de D. J. Selkoe, *Nature* 426:900, 2003, Fig. 1. (b) PDB ID 1IYT, O. Crescenzi et al., *Eur. J. Biochem.* 269:5642, 2002. (c) PDB ID 2BEG, T. Lührs et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:17,342, 2005.]

e perda de peso, sendo que muitos morrem no primeiro ano após o diagnóstico. Os órgãos mais afetados são os rins e o coração. Algumas amiloidoses estão associadas com outros tipos de doenças. Indivíduos com certas infecções crônicas

ou doenças inflamatórias, como artrite reumatoide, tuberculose, fibrose cística e alguns cânceres, podem ter um grande aumento na secreção de um polipeptídeo pró-amiloide, chamado de proteína amiloide sérica A (SAA, do inglês, *serum amyloid A*). Essa proteína, ou fragmentos dessa proteína, deposita-se no tecido conectivo do baço, dos rins, do fígado e ao redor do coração. Indivíduos com essa condição, conhecida como amiloidose sistêmica secundária, apresentam sintomas variados, dependendo dos órgãos que primeiro são afetados. A doença geralmente leva a óbito em poucos anos. Mais de 80 amiloidoses estão associadas com mutações na transtirretina (proteína que liga os hormônios da tireoide e os transporta, distribuindo-os pelo organismo todo, inclusive o cérebro). Uma grande variedade de mutações nessa proteína leva à deposição amiloide, concentrada ao redor de diferentes tecidos, levando a diferentes sintomas. As amiloidoses também estão associadas com mutações hereditárias nas proteínas lisozima, cadeia α do fibrinogênio A e apolipoproteínas A-I e A-II, todas descritas em capítulos posteriores.

Algumas doenças amiloides estão associadas com órgãos específicos. A proteína pró-amiloide geralmente é secretada somente pelos tecidos afetados, e sua alta concentração local leva à deposição de amiloide ao redor do tecido (embora algumas proteínas possam ser distribuídas sistematicamente). Um lugar comum de deposição de amiloide é próximo às células das ilhotas β do pâncreas, responsáveis pela secreção de insulina e pela regulação do metabolismo de glicose (ver Figura 23-27). A secreção pelas células β de um peptídeo pequeno (37 aminoácidos), chamado de polipeptídeo amiloide das ilhotas (PPAI, ou IAPP, do inglês, *islet amyloid polypeptide*), pode levar à deposição de amiloide ao redor das ilhotas, destruindo gradualmente as células. Uma pessoa adulta saudável tem de 1 milhão a 1,5 milhões de células β . Com a perda progressiva dessas células, a homeostasia de glicose é afetada e, no final, quando 50% ou mais células foram perdidas, a condição evolui para diabetes melito tipo 2 (independente de insulina).

As doenças de deposição amiloide que induzem neurodegeneração, sobretudo em adultos idosos, são uma classe especial de amiloidoses localizadas. A doença de Alzheimer está associada com a deposição extracelular de amiloide pelos neurônios, envolvendo o peptídeo β -amiloide (Figura 4-32B) derivado de uma grande proteína transmembrana (proteína precursora do peptídeo β -amiloide) encontrada na maioria dos tecidos humanos. Quando faz parte da proteína maior, o peptídeo é composto por dois segmentos α -helicoidais que atravessam a membrana. Quando os domínios externos e internos são clivados por proteases específicas, o peptídeo β amiloide, que é relativamente instável, deixa a membrana e perde a estrutura em α -hélice. Eles então tomam a forma de duas folhas β paralelas estendidas que se associam lentamente, formando as fibrilas amiloides (Figura 4-32C). O depósito dessas fibras amiloides parece ser a causa primária da doença de Alzheimer, mas um segundo tipo de agregado do tipo amiloide, envolvendo a proteína chamada tau, também ocorre intracelularmente (nos neurônios) em pessoas com doença de Alzheimer. Mutações hereditárias na proteína tau não resultam em Alzheimer, mas causam demência frontotemporal e parkinsonismo (condição com sintomas que lembram a doença de Parkinson), o que pode ser igualmente devastador.

QUADRO 4-6



MEDICINA

Morte por enovelamento errado: doenças de príons

Uma proteína cerebral enovelada de forma errada parece ser o agente causador de um grupo de doenças neurodegenerativas raras em mamíferos. Talvez a mais conhecida seja a encefalopatia espongiforme bovina (EEB, ou BSE, do inglês, *bovine spongiform encephalopathy*), também conhecida como doença da vaca louca. Doenças semelhantes incluem a kuru e a doença de Creutzfeldt-Jakob no homem, *scrapie* em ovinos e doença debilitante crônica em cervos e alces. Essas doenças também são conhecidas como encefalopatias espongiformes, uma vez que o cérebro do doente frequentemente fica cheio de cavidades (Figura Q-1). A deterioração progressiva do cérebro leva a um espectro de sintomas neurológicos, incluindo perda de peso, comportamento errático, problemas de postura, equilíbrio e coordenação e perda da capacidade cognitiva. Essas doenças são fatais.

Nos anos de 1960, pesquisadores descobriram que preparações dos agentes causadores de doença pareciam não conter ácidos nucleicos. Naquela época, Tikvah Alper sugeriu que o agente fosse uma proteína. Inicialmente, a ideia pareceu uma heresia. Todos os agentes causadores de doenças conhecidos até aquele momento – vírus, bactérias, fungos, e assim por diante – continham ácidos nucleicos, e sua virulência estava relacionada à reprodução genética e à propagação. Entretanto, quatro décadas de investigações, realizadas de maneira notável por Stanley Prusiner, forneceram evidências de que as encefalopatias espongiformes são diferentes.

O agente infeccioso foi identificado como uma única proteína (M_r 28.000), que Prusiner apelidou de proteína **príon** (PrP). O nome foi derivado de *proteinaceous infectious* (proteína infecciosa), mas Prusiner achou que

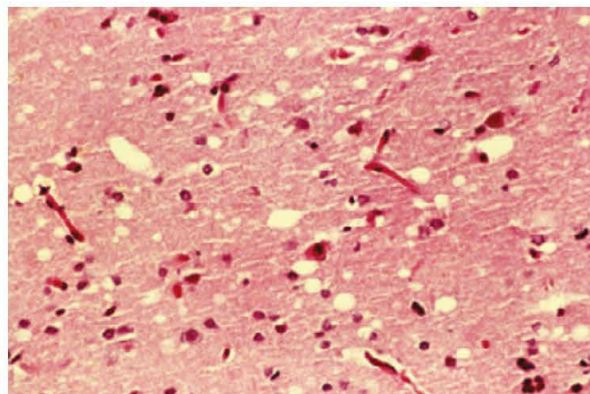


FIGURA Q-1 Esta secção corada de córtex cerebral da necropsia de um paciente com a doença de Creutzfeldt-Jakob mostra a degeneração espongiforme (vacuolar), a característica neuro-histológica mais comum. Os vacúolos amarelados são intracelulares e ocorrem, majoritariamente, em processos pré e pós-sinápticos de neurônios. Nesta secção, o diâmetro dos vacúolos varia entre 20 a 100 μm . [Fonte: Ralph C. Eagle, Jr./Science Source.]

“príon” soava melhor do que “proín”. A proteína príon é um constituinte normal do tecido cerebral em todos os mamíferos. Seu papel não é conhecido em detalhes, mas pode ter uma função de sinalização molecular. Linhagens de camundongos sem o gene para PrP (e, por isso, sem a proteína) sofrem efeitos prejudiciais muito aparentes. A doença ocorre somente quando a PrP celular normal, ou PrP^C, apresenta uma conformação alterada, chamada de PrP^{Sc} (Sc significa *scrapie*). A estrutura da PrP^C pos-

Várias outras condições neurodegenerativas envolvem a agregação intracelular de proteínas com enovelamento errado. Na doença de Parkinson, a forma mal enovelada da proteína α -sinucleína se agrega em massas esféricas filamentosas, chamadas de corpos de Lewy. A doença de Huntington envolve a proteína huntingtina, que tem uma longa repetição de poliglutaminas. Em alguns indivíduos, essa repetição é maior do que o normal, ocorrendo um tipo de agregação intracelular mais sutil. Notavelmente, quando proteínas mutantes humanas envolvidas nas doenças de Parkinson e Huntington são expressas em *Drosophila melanogaster*, as moscas apresentam degeneração que se manifesta como deterioração dos olhos, tremores e morte precoce. Todos esses sintomas são altamente suprimidos se a expressão da chaperona Hsp70 também estiver aumentada.

O mal enovelamento proteico não significa, necessariamente, que a formação de amiloide cause doenças sérias. Por exemplo, a fibrose cística é causada por defeitos em uma proteína de membrana chamada regulador da condutância transmembrana da fibrose cística (CFTR, do inglês, *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), que atua como canal iônico de cloreto. A mutação mais comum que causa a fibrose cística é uma deleção de um

resíduo Phe na posição 508 da CFTR, o que causa o enovelamento inapropriado da proteína. A maior parte dessa proteína é, então, degradada, e a função normal é perdida (ver Quadro 11-2). Muitas das doenças relacionadas com mutações no colágeno (p. 130) também causam um enovelamento defeituoso. Um tipo particular e famoso de enovelamento errado de proteína pode ser visto nas doenças priônicas (Quadro 4-6).

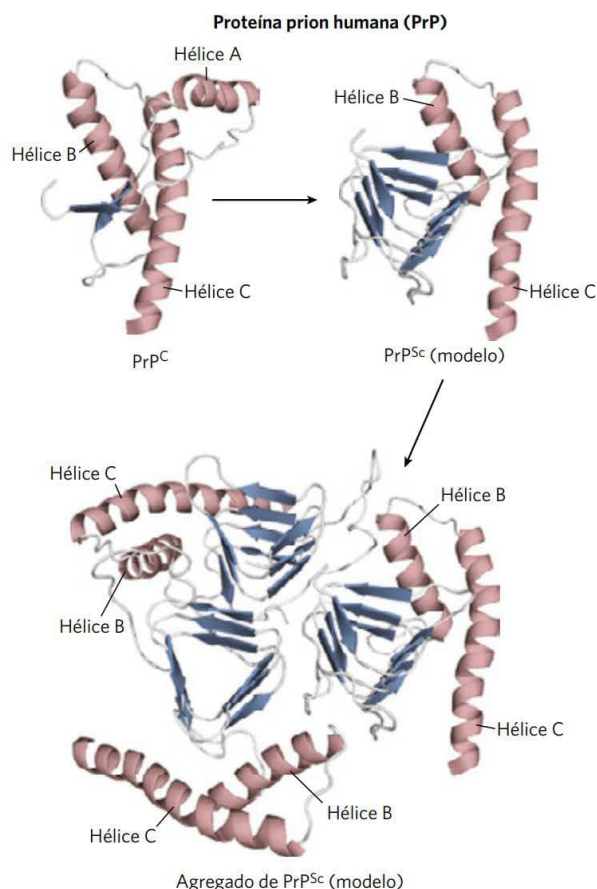
RESUMO 4.4 Desnaturação e enovelamento de proteínas

- A manutenção do estado estacionário do repertório de proteínas celulares ativas necessárias em determinadas condições específicas – chamada de proteostase – envolve um conjunto elaborado de vias e processos que enovelam, reenovam e degradam cadeias polipeptídicas.
- A estrutura tridimensional e a função da maioria das proteínas podem ser destruídas pela desnaturação, o que demonstra haver uma relação entre estrutura e função. Algumas proteínas desnaturadas podem renaturar espontaneamente para formar proteínas biologicamente ativas, demonstrando que as estruturas terciárias são determinadas pela sequência de aminoácidos.

sui duas α -hélices. A estrutura da PrP^{Sc} é muito diferente, pois a maior parte da estrutura foi convertida em folha β do tipo amiloide (Figura Q-2). A interação da PrP^{Sc} com a PrP^C converte esta última em PrP^{Sc}, iniciando um efeito dominó no qual cada vez mais proteínas do cérebro se convertem na forma que causa a doença. O mecanismo pelo qual a presença de PrP^{Sc} resulta em encefalopatia espongiforme não é conhecido.

A forma hereditária das doenças priônicas, uma mutação no gene que codifica a PrP, produz mudança em um resíduo de aminoácido que, supõem-se, torna a conversão de PrP^C em PrP^{Sc} mais favorável. Para se chegar a ter um entendimento completo das doenças priônicas ainda é preciso aguardar por novas informações sobre como a proteína príon afeta as funções cerebrais. Informações estruturais sobre PrP estão começando a fornecer indicativos quanto aos processos moleculares que permitem às proteínas priônicas interagirem de forma a alterar suas conformações (Figura Q-2). A importância dos príons pode ir muito além das encefalopatias espongiformes. Estão se acumulando evidências indicando que proteínas do tipo príon podem ser responsáveis por outras doenças neurodegenerativas, como a atrofia sistêmica múltipla.

FIGURA Q-2 Estrutura do domínio globular da PrP humana e modelos da conformação da PrP^{Sc} mal enovelada que causa a doença e se agrega em PrP^{Sc}. As α -hélices estão marcadas para ajudar a ilustrar as mudanças na conformação. A hélice A é incorporada na estrutura da folha β da conformação mal enovelada. [Fontes: PrP humana de PDB ID 1QLX, R. Zahn et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:145, 2000. Modelos de C. Govaerts et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:8342, 2004.]



- O enovelamento de proteínas nas células é geralmente hierárquico. Inicialmente, regiões de estrutura secundária podem se formar e isso é seguido pelo enovelamento em motivos e domínios. Grandes conjuntos de intermediários enovelados são rapidamente levados a uma única conformação nativa.
- Para muitas proteínas, o enovelamento é facilitado por chaperonas Hsp70 e por chaperoninas. A formação de ligações dissulfeto e a isomerização *cis-trans* de ligações peptídicas contendo Pro são catalisadas por enzimas específicas.
- O enovelamento errado é a base molecular de uma grande variedade de doenças humanas, incluindo as amiloidoses.

Termos-chave

Termos em negrito estão definidos no glossário.

conformação 115	grupo peptídico 117
conformação nativa 115	diagrama de Ramachandran 119
efeito hidrofóbico 116	
camada de solvatação 116	estrutura secundária 119

α-hélice 120
conformação β 123
folha β 123
curva β 123
espectroscopia de dicroísmo circular (CD) 125
estrutura terciária 125
estrutura quaternária 125
proteínas fibrosas 125
proteínas globulares 125
α -queratina 126
colágeno 127
fibroína de seda 130
Protein Data Bank (PDB) 132
motivo 133
enovelamento 133
domínio 137
proteínas intrinsecamente desordenadas 138

diagrama de topologia 140
família de proteínas 140
multímero 141
oligômero 141
protômero 141
proteostasia 142
desnaturação 143
renaturação 144
chaperona 146
Hsp70 146
chaperonina 146
proteína dissulfeto-isomerase (PDI) 147
peptídeo prolil <i>cis-trans</i> isomerase (PPI) 147
amiloide 147
amiloidoses 147
autofagia 148
príon 150

Teste seu conhecimento

1. Propriedades da ligação peptídica Nos estudos de raios X de peptídeos cristalizados, Linus Pauling e Robert Corey constataram que a ligação C—N da ligação peptídica tem um comprimento intermediário (1,32 Å) entre o comprimento de uma ligação simples C—N (1,49 Å) e o comprimento de uma ligação dupla C=N (1,27 Å). Eles também observaram que a ligação peptídica é planar (todos os quatro átomos ligados ao grupo C—N estão no mesmo plano) e que os dois átomos de carbono ligados ao C—N são sempre *trans* um em relação ao outro (em lados opostos da ligação peptídica).

- O que o comprimento da ligação C—N da ligação peptídica indica sobre a força e a ordem de ligação (i.e., se ela é simples, dupla ou tripla)?
- O que as observações de Pauling e Corey nos dizem a respeito da facilidade de rotação sobre o eixo C—N da ligação peptídica?

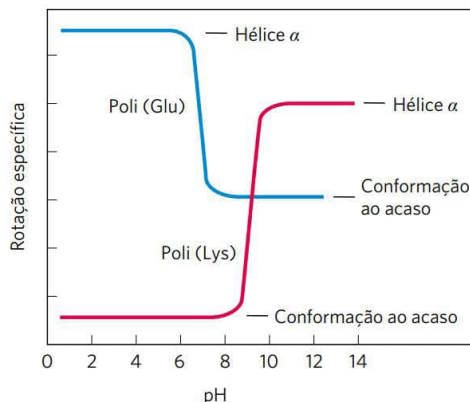
2. Relações estruturais e funcionais em proteínas fibrosas William Astbury descobriu que o padrão de difração de raios X da lã mostra uma unidade estrutural repetida espaçada de 5,2 Å ao longo do comprimento da fibra de lã. Quando ele fervia e esticava a lã, o padrão de raios X mostrava uma nova unidade estrutural que se repetia, com um espaçamento de 7,0 Å. Ferver e esticar a lã e depois deixar ela se retrair novamente resulta em um padrão de raios X consistente com o espaçamento original de 5,2 Å. Embora as observações fornecessem pistas importantes sobre a estrutura molecular da lã, Astbury não foi capaz de interpretá-las naquela época.

- Levando em conta o atual conhecimento sobre a estrutura da lã, interprete as observações de Astbury.
- Blusões e meias de lã encolhem quando são lavados em água quente ou aquecidos em uma máquina de secar roupa. Por outro lado, nas mesmas condições a seda não encolhe. Explique.

3. Velocidade da síntese do cabelo, α -queratina O cabelo cresce com a velocidade de 15 a 20 cm/ano. Todo esse crescimento está concentrado na base da fibra de cabelo, onde os filamentos de α -queratina são sintetizados dentro das células vivas da epiderme, sendo arranjados em estruturas com formato de cordas (ver Figura 4-11). O elemento estrutural principal da α -queratina é a α -hélice, que tem 3,6 resíduos de aminoácidos por volta e avança 5,4 Å por volta (ver Figura 4-4a). Supondo que a biossíntese de cadeias de queratina α -helicoidal é o fator limitante da velocidade de crescimento do cabelo, calcule a velocidade na qual as ligações peptídicas das cadeias de α -queratina devem ser sintetizadas (ligações peptídicas por segundo) para justificar o crescimento anual observado para o cabelo.

4. Efeito do pH sobre a conformação das estruturas secundárias da α -hélice O desdobramento de um polipeptídeo para formar uma estrutura enovelada aleatoriamente é acompanhado por um grande decréscimo em uma propriedade, chamada de rotação específica, que mede a capacidade que uma solução possui de desviar a luz circularmente polarizada. Poliglutamato, um polipeptídido formado unicamente por resíduos de L-Glu, tem conformação de α -hélice em pH 3. Quando o pH sobe para 7, há uma grande perda da rotação específica da solução. Da mesma forma, a polilisina (resíduos L-Lys) forma uma α -hélice em pH 10, mas, quando o pH

é diminuído para 7, a rotação específica também diminui, como mostrado no gráfico a seguir.

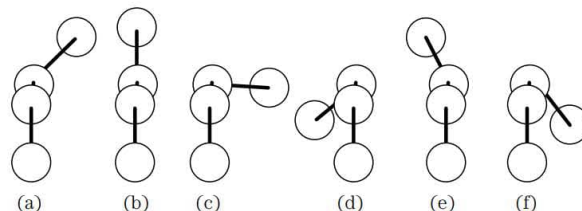


Qual é a explicação para o efeito da mudança de pH nas conformações de poli(Glu) e de poli(Lys)? Por que a transição ocorre em uma faixa tão estreita de pH?

5. Ligações dissulfeto determinam as propriedades de diversas proteínas Algumas proteínas naturais são ricas em ligações dissulfeto, e suas propriedades mecânicas (tensão elástica, viscosidade, dureza, etc.) estão correlacionadas com o grau de ligações dissulfeto.

- A glutenina, proteína do trigo rica em ligações dissulfeto, é responsável pelo caráter aderente e elástico da massa feita com farinha de trigo. De modo similar, a natureza dura e resistente do casco da tartaruga é devida às inúmeras ligações dissulfeto da sua α -queratina. Qual é a base molecular para a correlação entre o conteúdo de ligações dissulfeto e as propriedades mecânicas da proteína?
- A maioria das proteínas globulares desnaturam e perdem a atividade quando aquecida brevemente a 65°C. Entretanto, proteínas globulares que possuem muitas ligações dissulfeto geralmente devem ser aquecidas por mais tempo e a uma temperatura maior para desnaturarem. Uma dessas proteínas é o inibidor de tripsina pancreática bovina (BPTI, do inglês, *bovine pancreatic trypsin inhibitor*), que tem 58 resíduos de aminoácidos em uma única cadeia e contém três ligações dissulfeto. Após o resfriamento de uma solução de BPTI desnaturada, a atividade da proteína é restaurada. Qual é a base molecular para essa propriedade?

6. Ângulos diedros Séries de ângulos de torção, ϕ e ψ , que devem ser considerados em um esqueleto peptídico estão mostradas abaixo. Qual dessas séries corresponde mais proximamente aos ângulos ϕ e ψ de uma tripla hélice de colágeno ideal? Consulte Figura 4-9 como guia.



7. Sequência de aminoácidos e estrutura de proteínas O crescente entendimento de como as proteínas se enovelam

permite que os pesquisadores façam previsões sobre a estrutura de uma proteína com base em dados sobre a sequência primária de aminoácidos. Considere a seguinte sequência de aminoácidos:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ile	Ala	His	Thr	Tyr	Gly	Pro	Phe	Glu	Ala
11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Ala	Met	Cys	Lys	Trp	Glu	Ala	Gln	Pro	Asp
21	22	23	24	25	26	27	28		
Gly	Met	Glu	Cys	Ala	Phe	His	Arg		

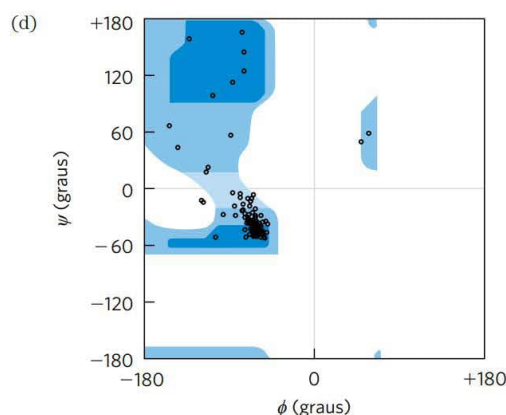
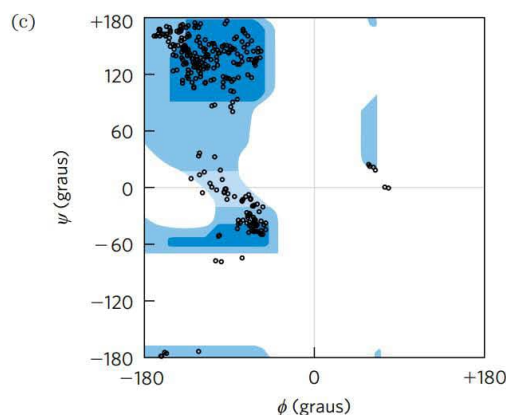
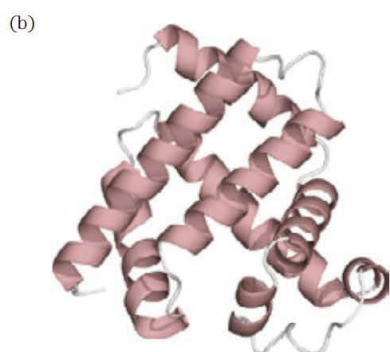
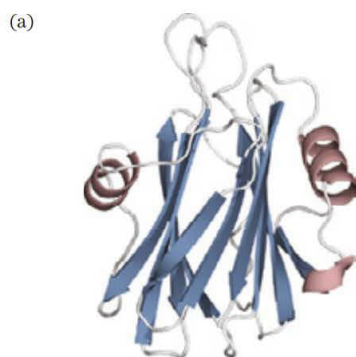
- Onde podem ocorrer curvas ou voltas em β ?
- Onde devem se formar ligações dissulfeto intracadeias?
- Supondo que essa sequência é parte de uma proteína globular maior, indique a localização provável (na superfície externa ou no interior da proteína) dos seguintes resíduos de aminoácido: Asp, Ile, Thr, Ala, Gln, Lys. Explique o raciocínio utilizado. (Dica: observe o índice de hidropatia na Tabela 3-1.)

8. A bacteriorrodopsina em proteínas púrpuras de membrana Sob condições ambientais adequadas, a arqueobactéria *Halobacterium halobium* sintetiza uma proteína de

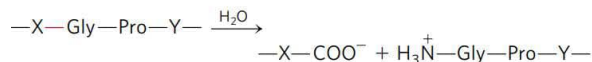
membrana (M_r 26.000) conhecida como bacteriorrodopsina, que é púrpura devido a seu conteúdo em retinal (ver Figura 10-20). Moléculas dessa proteína se agregam em “manchas púrpuras” na membrana celular. A bacteriorrodopsina atua como bomba de prótons ativada pela luz, que fornece energia para as funções da célula. A análise por raios X dessa proteína revela que ela consiste em sete segmentos α -helicoidais paralelos, cada um deles atravessando a membrana celular da bactéria (espessura de 45 Å). Calcule o número mínimo de resíduos de aminoácidos necessários para um segmento de α -hélice atravessar completamente a membrana. Estime a fração proteica da bacteriorrodopsina que está envolvida em hélices transmembrana. (Use uma massa média de 110 para os resíduos de aminoácido.)

9. Terminologia da estrutura de proteínas A mioglobina é um motivo, um domínio ou uma estrutura tridimensional completa?

10. Interpretando os diagramas de Ramachandran Examine as duas proteínas, marcadas (a) e (b), abaixo. Quais dos dois diagramas de Ramachandran, marcados (c) e (d), é mais provável ser obtido de cada uma das proteínas? Por quê? [Fontes: (a) PDB ID 1GWY, J. M. Mancheno et al., *Structure* 11:1319, 2003. (b) PDB ID 1A6M, J. Vojtechovsky et al., *Biophys. J.* 77:2153, 1999.]

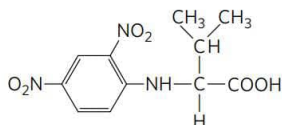


11. Ação patogênica da bactéria que causa gangrena gasosa A bactéria anaeróbica altamente patogênica *Clostridium perfringens* é responsável pela gangrena gasosa, condição na qual o tecido animal tem a sua estrutura destruída. Essa bactéria secreta uma enzima que catalisa de maneira eficiente a hidrólise das ligações peptídicas indicadas em vermelho:



em que X e Y são qualquer um dos 20 aminoácidos comuns. Como a secreção dessa enzima contribui para a capacidade de invasão dessa bactéria nos tecidos humanos? Por que essa enzima não afeta a própria bactéria?

12. Número de cadeias polipeptídicas em uma proteína com múltiplas subunidades Uma amostra (660 mg) de uma proteína oligomérica de M_r 132.000 foi tratada com um excesso de 1-flúor-2,4-dinitrobenzeno (reagente de Sanger) sob condições levemente alcalinas até que a reação química se completasse. As ligações peptídicas da proteína foram, então, completamente hidrolisadas pelo aquecimento com HCl concentrado. O hidrolisado continha 5,5 mg do seguinte composto:



Derivados 2,4-dinitrofenil dos grupos α -amino de outros aminoácidos não foram encontrados.

- Explique como essa informação pode ser usada para determinar o número de cadeias polipeptídicas na proteína oligomérica.
- Calcule o número de cadeias polipeptídicas nesta proteína.
- Que outra técnica analítica poderia ser empregada para determinar se as cadeias polipeptídicas são iguais ou diferentes?

13. Predição de estrutura secundária Qual dos seguintes peptídeos é mais propenso a assumir uma estrutura α -helicoidal?

- LKAENDEAARAMSEA
- CRAGGFPPWDQPGTNS



14. Fibras amiloides e doenças Diversas moléculas aromáticas pequenas, como o vermelho de fenol (utilizado como modelo de fármaco não tóxico), são conhecidas por inibir a formação de amiloides em sistemas-modelo em laboratório. Um objetivo da pesquisa sobre esses compostos aromáticos pequenos é encontrar um fármaco que iniba de modo eficiente a formação de amiloides no cérebro de pessoas com início de doença de Alzheimer.

- Sugira por que moléculas com substituintes aromáticos evitariam a formação de amiloides.
- Alguns pesquisadores sugeriram que um fármaco para ser usado no tratamento da doença de Alzheimer deve também ter efeito no tratamento do diabetes melito tipo 2 (não dependente de insulina). Por que um único fármaco poderia ser eficaz para o tratamento dessas duas doenças diferentes?

Bioquímica online

15. Modelagem de proteínas na internet Um grupo de pacientes com a doença de Crohn (doença inflamatória do intestino) foi submetido à biópsia das mucosas intestinais para identificar o agente causador da doença. Os pesquisadores

identificaram uma proteína que estava presente em níveis mais altos nos pacientes com a doença de Crohn do que em pacientes com outras doenças inflamatórias do intestino, ou no grupo-controle. A proteína foi isolada, e a seguinte sequência *parcial* de aminoácidos foi obtida (leia da esquerda para a direita):

EAELCPDRCI	HSFQNLGIQC	VKKRDLEQAI
SQRIQTNNNP	FQVPIEEQRG	DYDLNAVRLC
FQVTVRDPSG	RPLRLPPVLP	HPIFDNRAPN
TAEKICRVN	RNSGSLGGD	EIFLLCDKVQ
KEDIEVYFTG	PGWEARGSFS	QADVHRQVAI
VFRTPPYADP	SLQAPVRVSM	QLRRPSDREL
SEPMFQYLP	DTDDRHRIE	KRKRTYETFK
SIMKSPFSG	PTDPRPPRR	IAPSRSSAS
VPKPAPQYP		

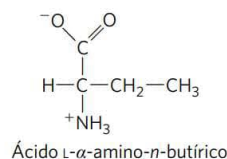
- Essa proteína pode ser identificada usando bancos de dados como o UniProt (www.uniprot.org). Na página inicial do *site*, clique para pesquisa BLAST. Uma vez na página do BLAST, coloque cerca de 30 resíduos da sequência da proteína no campo apropriado e envie para análise. O que essa análise lhe diz sobre a identidade da proteína?
- Tente utilizar diferentes porções da sequência de aminoácidos. O resultado obtido é sempre o mesmo?
- Vários *sites* da *web* fornecem informações sobre a estrutura tridimensional das proteínas. Encontre informações sobre as estruturas secundárias, terciária e quaternária usando *sites* de bancos de dados como o Protein Data Bank (PDB; www.rcsb.org) ou o Structural Classification of Proteins (SCOP2; <http://scop2.mrc-lmb.cam.ac.uk>).
- Durante essa busca na internet, o que você aprendeu sobre a função celular da proteína?

Problema de análise de dados

16. Imagem-espelhadas de proteínas Foi ressaltado, no Capítulo 3, que os resíduos de aminoácidos nas moléculas de proteína são exclusivamente estereoisômeros L. Até hoje, não está claro se essa seletividade é necessária para o funcionamento correto da proteína ou se é um acidente da evolução. Para explorar essa questão, Milton e colaboradores (1992) publicaram um estudo de uma enzima inteiramente formada de estereoisômeros D. A enzima que eles escolheram foi a protease do HIV, uma enzima proteolítica sintetizada pelo HIV que converte as pré-proteínas virais inativas nas formas ativas.

Anteriormente, Wlodawer e colaboradores (1989) relataram a síntese completa da protease do HIV a partir de aminoácidos L (a enzima L), usando o processo mostrado na Figura 3-32. As proteases do HIV normais contêm dois resíduos Cys nas posições 67 e 95. Como a síntese química de proteínas contendo Cys é tecnicamente difícil, Wlodawer e colaboradores substituíram os dois resíduos Cys da proteína pelo aminoácido sintético ácido L- α -amino-*n*-butírico (Aba). Segundo os autores, isso foi feito para “reduzir as dificuldades sintéticas associadas com a desproteção da Cys e para facilitar o manuseio do produto”.

- A estrutura do Aba é mostrada abaixo. Por que essa é uma substituição adequada para um resíduo Cys? Sob quais circunstâncias ela não seria adequada?



Wlodawer e colaboradores desnaturaram a proteína recém-sintetizada dissolvendo-a em guanidina HCl 6 M e então permitiram que ela se enovelasse lentamente, removendo a guanidina por diálise contra um tampão neutro (glicerol 10%, $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 25 mM, pH 7).

- (b) Existem várias razões para prever que uma proteína sintetizada, desnaturada e dobrada dessa maneira não seja ativa. Dê três razões para isso.
- (c) Surpreendentemente, a L-protease resultante foi ativa. O que essa descoberta informa sobre o papel das ligações dissulfeto na molécula de protease nativa do HIV?

Em seus estudos, Milton e colaboradores sintetizaram a protease do HIV a partir de D-aminoácidos, utilizando o mesmo protocolo do estudo anterior (Wlodawer et al.). Formalmente, existem três possibilidades para o enovelamento da D-protease: resultaria em uma molécula com (1) o mesmo formato da L-protease; (2) a imagem especular da L-protease; ou (3) alguma outra coisa, possivelmente inativa.

- (d) Para cada uma das possibilidades, decida se elas são prováveis ou não e defenda a decisão.

Efetivamente, a D-protease foi ativa: ela hidrolisou um substrato sintético específico e foi inibida por inibidores específicos. Para examinar a estrutura de enzimas D e L, Milton e colaboradores testaram a atividade das duas formas com as formas D e L de substratos peptídicos quirais, e a capacidade de inibição pelas formas D e L de peptídeos quirais análogos ao substrato. As duas formas também foram testadas quanto à inibição pelo inibidor aquiral azul de Evans. Os resultados estão apresentados na tabela.

Protease do HIV	Hidrólise de substrato		Inibição		Azul de Evans (aquiral)
	D-substrato	L-substrato	Peptídeo inibidor		
			D-inibidor	L-inibidor	
L-protease	—	+	—	+	+
D-protease	+	—	+	—	+

- (e) Quais dos três modelos propostos acima são compatíveis com os dados apresentados? Explique o raciocínio utilizado.
- (f) Por que o azul de Evans inibe as duas formas da protease?
- (g) Seria de esperar que a quimotripsina digerisse a D-protease? Explique o raciocínio utilizado.
- (h) Seria de esperar que a síntese de alguma enzima totalmente com aminoácidos D seguida de renaturação produzisse uma enzima ativa? Explique o raciocínio utilizado.

Referências

- Milton, R.C., S.C. Milton e S.B. Kent. 1992.** Total chemical synthesis of a D-enzyme: the enantiomers of HIV-1 protease show demonstration of reciprocal chiral substrate specificity. *Science* 256:1445–1448.
- Wlodawer, A., M. Miller, M. Jaskólski, B.K. Sathyanarayana, E. Baldwin, I.T. Weber, L.M. Selk, L. Clawson, J. Schneider e S.B. Kent. 1989.** Conserved folding in retroviral proteases: crystal structure of a synthetic HIV-1 protease. *Science* 245: 616–621.

Esta página foi deixada em branco intencionalmente.

Função proteica

- 5.1 Interação reversível de uma proteína com um ligante: proteínas de ligação ao oxigênio 158
- 5.2 Interações complementares entre proteínas e ligantes: o sistema imune e as imunoglobulinas 174
- 5.3 Interações proteicas moduladas por energia química: actina, miosina e motores moleculares 179

As proteínas agem por meio de interações com outras moléculas. Conhecer a estrutura tridimensional das proteínas é uma etapa importante para poder entender como as proteínas funcionam. A biologia estrutural moderna geralmente inclui conhecimento sobre interações moleculares. Contudo, as proteínas cujas estruturas foram examinadas até agora são enganosamente estáticas. Proteínas são moléculas dinâmicas. As interações entre moléculas são influenciadas de maneira a ter importância fisiológica. Algumas vezes as mudanças na conformação da proteína são sutis e outras vezes são enormes. Este capítulo e o capítulo seguinte exploram o assunto de como as proteínas interagem com outras moléculas e como essas interações estão relacionadas com a dinâmica da estrutura proteica. Essas interações serão divididas em dois tipos. Algumas dessas interações levam à alteração na configuração química ou na composição das moléculas que interagem com proteínas que agem como catalisadores, ou **enzimas**. As enzimas e as reações nas quais elas estão envolvidas serão discutidas no Capítulo 6. No caso das interações que são objeto do presente capítulo, tanto a configuração química como a composição das moléculas que interagem não sofrem modificação.

Parece um contrassenso o fato de que a interação de uma proteína com outra molécula seja importante se essa interação não leva a uma alteração da molécula envolvida. Mesmo assim, interações transientes desse tipo são centrais para processos fisiológicos complexos, como o transporte de oxigênio, a função imune e a contração muscular – tópicos que serão discutidos a seguir. As proteínas responsáveis por esses processos ilustram vários dos princípios-chave da função das proteínas, alguns dos quais já são familiares depois do Capítulo 4:

As funções de muitas proteínas envolvem uma ligação reversível com outras moléculas. Uma molécula que interage de modo reversível com uma proteína é chamada de **ligante**. Um ligante pode ser qualquer tipo de molé-

cula, inclusive outra proteína. A natureza transitória das interações proteína-ligante é fundamental para a vida, pois permite que um organismo responda de maneira rápida e reversível a mudanças no ambiente e nas condições metabólicas.

Um ligante interage com uma região da proteína chamada de **sítio de ligação**, que é complementar ao ligante em tamanho, forma, carga e caráter hidrofílico ou hidrofóbico. Além disso, a interação é específica: a proteína pode diferenciar uma única ou algumas poucas entre as milhares de moléculas diferentes presentes no ambiente e interagir seletivamente somente com uma ou com várias delas. Determinada proteína pode ter sítios de ligação separados para vários ligantes diferentes. Essas interações moleculares específicas são cruciais na manutenção do alto grau de ordem de um sistema vivo. (Esta discussão exclui a ligação da água, que pode interagir fraca e inespecificamente com muitas partes de uma proteína. O Capítulo 6 estuda a água como ligante específico de muitas enzimas.)

As proteínas são flexíveis. Mudanças na conformação podem ser sutis, refletindo vibrações moleculares e pequenos movimentos de resíduos de aminoácidos por toda a proteína. Assim, diz-se que uma proteína flexível está “respirando”. Mudanças na conformação também podem ser muito significativas, com segmentos importantes da estrutura proteica movendo-se por distâncias de até vários nanômetros. Na maioria das vezes, mudanças conformacionais específicas são essenciais para a função da proteína.

A interação de uma proteína com o seu ligante é frequentemente acoplada a uma mudança na conformação da proteína que torna o sítio de ligação mais complementar ao ligante, permitindo uma interação mais firme. A adaptação estrutural que ocorre entre proteína e ligante é chamada de **encaixe induzido**.

Em uma proteína com várias subunidades, frequentemente, mudanças conformacionais em uma delas afetam a conformação das demais.

As interações entre proteínas e ligantes podem ser reguladas, geralmente por meio de interações específicas com um ou mais ligantes adicionais, causando mudanças conformacionais na proteína, as quais afetam a interação com o primeiro ligante.

As enzimas constituem um caso especial de função proteica. Elas ligam outras moléculas e as transformam quimicamente. As moléculas sobre as quais as enzimas exercem seus efeitos são chamadas de **substratos** da reação, em vez de ligante, e o sítio de ligação é chamado de **sítio catalítico** ou **sítio ativo**. Como será visto mais adiante, os temas discutidos neste capítulo – ligação, especificidade e mudanças de conformação – continuarão a ser abordados no Capítulo 6, acrescentados pelo assunto da participação das proteínas em transformações químicas.

5.1 Interação reversível de uma proteína com um ligante: proteínas de ligação ao oxigênio

A mioglobina e a **hemoglobina** talvez sejam as proteínas mais estudadas e mais bem compreendidas. Elas foram as primeiras proteínas a terem as estruturas tridimensionais conhecidas e ilustram praticamente todos os aspectos de um processo bioquímico fundamental: a ligação reversível de um ligante a uma proteína. Esse modelo clássico de função proteica é muito útil para compreender como as proteínas funcionam.

O oxigênio liga-se ao grupo prostético heme

O oxigênio é pouco solúvel em soluções aquosas (ver Tabela 2-3) e não pode ser transportado para os tecidos em quantidade suficiente se estiver simplesmente dissolvido no plasma sanguíneo. A difusão do oxigênio pelos tecidos também não é eficiente em distâncias maiores do que alguns milímetros. A evolução dos animais maiores e multicelulares dependeu do desenvolvimento de proteínas capazes de transportar e armazenar oxigênio. Contudo, nenhuma cadeia lateral dos aminoácidos das proteínas é adaptada para a ligação reversível com moléculas de oxigênio. Essa função é exercida por determinados metais de transição, entre eles o cobre e o ferro, que apresentam forte tendência para ligar oxigênio. Os organismos multicelulares exploram as pro-

priedades dos metais, sobretudo do ferro, para o transporte do oxigênio. Contudo, o ferro livre promove a formação de espécies de oxigênio altamente reativas, como as hidroxilas, que podem danificar o DNA e outras macromoléculas. Por isso, o ferro usado nas células está ligado a formas que o sequestram e/ou o tornam menos reativo. Nos organismos multicelulares – principalmente aqueles nos quais o ferro, com sua capacidade de transportar oxigênio, deve ser transportado a grandes distâncias –, o ferro é frequentemente incorporado em um grupo prostético ligado à proteína chamada de **heme**. (Lembre-se, do Capítulo 3, que um grupo prostético é um composto associado permanentemente a uma proteína e contribui para a função da proteína.)

O heme consiste em uma complexa estrutura orgânica em anel, a **protoporfirina**, à qual se liga um único átomo de ferro no estado ferroso (Fe^{2+}) (**Figura 5-1**). Esse átomo de ferro tem seis ligações de coordenação, quatro delas com os átomos de nitrogênio que fazem parte do sistema plano do **anel de porfirina** e duas perpendiculares à porfirina. Os átomos de nitrogênio coordenados (que têm caráter de doador de elétrons) ajudam a evitar a conversão do ferro do heme para o estado férrico (Fe^{3+}). No estado Fe^{2+} , o ferro liga oxigênio de forma reversível; no estado Fe^{3+} , ele não liga oxigênio. O heme é encontrado em muitas proteínas transportadoras de oxigênio, assim como em algumas proteínas que participam das reações de oxirredução (transferência de elétrons), como os citocromos (Capítulo 19).

As moléculas de heme livres (não ligadas a uma proteína) deixam o Fe^{2+} com duas ligações de coordenação “abertas”. A reação simultânea de uma molécula de O_2 com duas moléculas de heme livres (ou dois Fe^{2+} livres) pode resultar em uma conversão irreversível de Fe^{2+} em Fe^{3+} . Nas proteínas que contêm heme, essa reação é impedida pelo sequestro do heme no interior da estrutura da proteína. Assim, o acesso às duas ligações de coordenação abertas fica restrito. Nas globinas, uma dessas duas ligações de coordenação é ocupada por um nitrogênio da cadeia lateral de um resíduo de His conservado, denominado

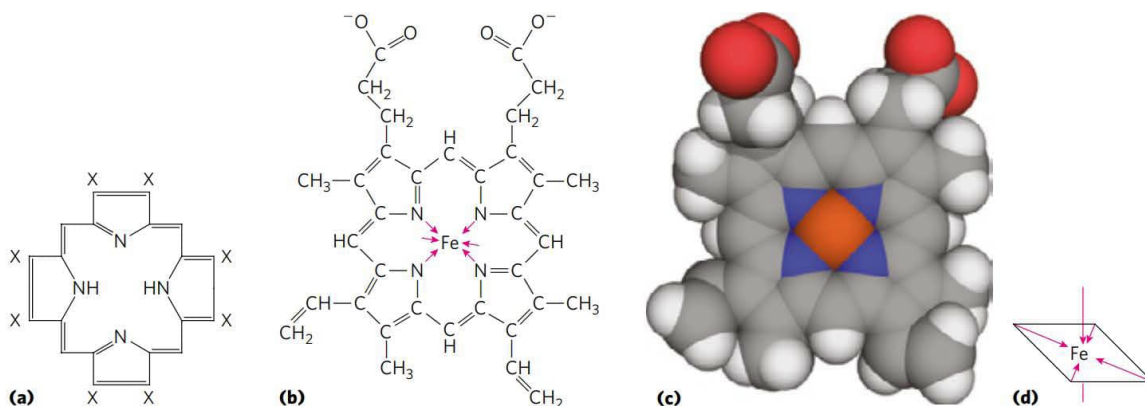


FIGURA 5-1 Heme. O grupo heme está presente na mioglobina, na hemoglobina e em muitas outras proteínas, denominadas **hemeproteínas**. O heme consiste em uma estrutura orgânica complexa em anel, a protoporfirina IX, com um átomo de ferro ligado no estado ferroso (Fe^{2+}). **(a)** As porfirinas, das quais a protoporfirina IX é apenas mais um exemplo, são constituídas de quatro grupos pirrólicos ligados por pontes de meteno com substituições em uma ou mais das posições marcadas com X. **(b, c)** Duas representações do heme. O átomo de ferro tem seis ligações de coordenação: quatro no plano do anel e **(d)** duas ligadas perpendicularmente ao sistema do anel planar da porfirina. [Fonte: (c) heme extraído de PDB ID 1CCR, H. Ochi et al., *J. Mol. Biol.* 166:407, 1983.]

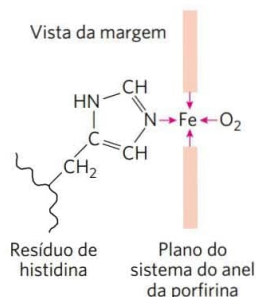


FIGURA 5-2 Vista lateral do grupo heme. Esta vista mostra as duas ligações de coordenação com o Fe^{2+} perpendiculares ao sistema de anel da porfirina. Uma é ocupada por um resíduo de His, denominado His proximal, His⁹³ na mioglobina, também designado His F8 (o 8º resíduo na α -hélice F; ver Figura 5-3) e a outra ligação de coordenação é o sítio de ligação do oxigênio. As quatro ligações de coordenação remanescentes estão no plano do anel e ligadas ao sistema de anel planar da porfirina.

His proximal. A outra é o sítio de ligação para o oxigênio molecular (O_2) (Figura 5-2). Quando o oxigênio se liga, as propriedades eletrônicas do ferro são alteradas. Isso leva à mudança da cor do sangue venoso pobre em oxigênio, marrom avermelhado, para o vermelho-brilhante do sangue arterial rico em oxigênio. Algumas moléculas pequenas, como o monóxido de carbono (CO) e o óxido nítrico (NO), coordenam com o ferro do heme com maior afinidade do que o O_2 . Quando uma molécula de CO está ligada ao heme, o O_2 é excluído, e, por isso, o CO é altamente tóxico para os organismos aeróbicos (tópico explorado mais adiante, no Quadro 5-1). As proteínas que ligam oxigênio regulam o acesso de moléculas pequenas ao ferro do heme envolvendo e sequestrando o heme.

As globinas são uma família de proteínas de ligação ao oxigênio

As **globinas** formam uma ampla família de proteínas, todas com estruturas primária e terciária semelhantes. As globinas são comumente encontradas em todas as classes dos eucariotos e mesmo em algumas bactérias. A maioria atua no armazenamento ou no transporte de oxigênio, embora algumas tenham papel de sensores de oxigênio, óxido nítrico ou monóxido de carbono. Um nematódeo muito simples, o *Caenorhabditis elegans*, tem genes que codificam 33 diferentes globinas. Nos seres humanos e em outros mamíferos existem, pelo menos, quatro tipos diferentes de globinas. A mioglobina monomérica facilita a difusão do oxigênio no tecido muscular. A mioglobina é particularmente abundante nos músculos de mamíferos marinhos, como as focas e as baleias, pois também exerce função de armazenamento de oxigênio em mergulhos prolongados. A hemoglobina na forma de tetrâmero é responsável pelo transporte de oxigênio na corrente sanguínea. A neuroglobina monomérica é expressa em neurônios e ajuda a proteger o cérebro da hipóxia (baixo nível de oxigênio) ou da isquemia (restrição do suprimento de sangue). A citoglobina, uma outra globina monomérica, é encontrada em alta concentração na parede dos vasos sanguíneos e sua função é regular os níveis de óxido nítrico (Discutido nos Capítulos 12 e 23).

A mioglobina tem um único sítio de ligação ao oxigênio

A mioglobina (M_r 16.700; abreviada Mb) consiste em um único polipeptídeo de 153 resíduos de aminoácidos com uma molécula de heme. Como é típico nos polipeptídeos de globina, a mioglobina é formada por oito segmentos α -hélices conectados por inflexões (Figura 5-3). Cerca de 78% dos resíduos de aminoácidos das proteínas estão nessas α -hélices.

Qualquer discussão detalhada sobre a função proteica precisa incluir o assunto da estrutura da proteína. No caso da mioglobina, primeiro serão apresentadas certas regras estruturais características das globinas. Como pode ser visto na Figura 5-3, os segmentos helicoidais são denominados de A a H. Um resíduo de aminoácido é nomeado pela posição na sequência de aminoácidos ou por sua localização na sequência de um segmento de α -hélice específico. Por exemplo, o resíduo de His coordenado ao heme da mioglobina, a His proximal, isto é, a His⁹³ (o 93º resíduo a partir da extremidade aminoterminal da cadeia polipeptídica da mioglobina) é também denominado His F8 (o 8º resíduo na α -hélice F). As inflexões (curvas) na estrutura são designadas AB, CD, EF, FG, e assim por diante, refletindo os respectivos segmentos conectados.

As interações proteína-ligante podem ser descritas quantitativamente

A função da mioglobina depende da capacidade da proteína de não somente ligar oxigênio, mas também de o liberar quando e onde ele for necessário. Em geral, as funções na bioquímica envolvem uma interação proteína-ligante reversível desse tipo. Descrever quantitativamente essas interações constitui a parte central de muitas investigações bioquímicas.

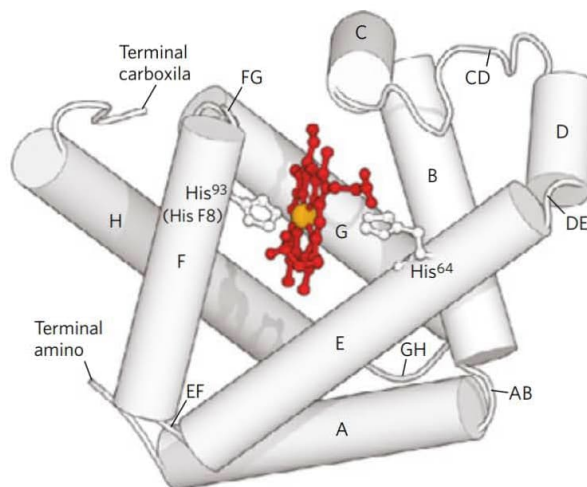


FIGURA 5-3 Mioglobina. Os oito segmentos de α -hélice (mostrados como cilindros) são denominados de A a H. Os resíduos das curvas que os conectam são denominados AB, DC, EF, e assim por diante, indicando os segmentos que conectam. Algumas curvas, incluindo BC e DE, são abruptas e não contêm resíduos de aminoácidos; normalmente elas não estão especificadas. O heme está ligado em um bolsão formado em sua maior parte pelas hélices E e F, embora resíduos de aminoácidos de outros segmentos da proteína também participem. [Fonte: PDB ID 1MBO, S. E. Phillips, *J. Mol. Biol.* 142:531, 1980.]

Em geral, a ligação reversível de uma proteína (P) a um ligante (L) pode ser descrita por uma **expressão de equilíbrio** simples:



A reação é caracterizada por uma constante de equilíbrio, K_a , tal que

$$K_a = \frac{[PL]}{[P][L]} = \frac{k_a}{k_d} \quad (5-2)$$

em que k_a e k_d são constantes de velocidade (detalhes serão discutidos mais adiante). O termo K_a é uma **constante de associação** (não confundir com K_d , que significa a constante de dissociação de um ácido; p. 62) que descreve o equilíbrio entre o complexo e os seus componentes separados. A constante de associação é uma medida da afinidade do ligante L pela proteína. K_a tem como unidade M^{-1} ; um valor alto de K_a corresponde a uma alta afinidade do ligante pela proteína.

O termo de equilíbrio K_a é equivalente também à razão entre as velocidades das reações direta (associação) e reversa (dissociação) que formam o complexo PL. A velocidade de associação é descrita pela constante de velocidade k_a , e a dissociação, pela constante de velocidade k_d . Conforme será discutido no capítulo seguinte, as constantes de velocidade são constantes de proporcionalidade que descrevem a fração de um conjunto de reagentes que reage em um dado espaço de tempo. Quando a reação envolve uma molécula, como a reação de dissociação $PL \rightarrow P + L$, a reação é de *primeira ordem* e a constante de dissociação (k_d) tem como unidade o inverso do tempo (s^{-1}). Quando a reação envolve duas moléculas, como no caso da reação de associação $P + L \rightarrow PL$, ela é denominada *segunda ordem* e a constante de associação (k_a) tem como unidade $M^{-1} s^{-1}$.

>> Convenção-chave: o símbolo da constante de equilíbrio é K (maiúsculo), e o símbolo da constante de velocidade é k (minúsculo). <<

O rearranjo da primeira parte da Equação 5-2 mostra que a razão entre a proteína ligada e a livre é diretamente proporcional à concentração de ligante livre.

$$K_a[L] = \frac{[PL]}{[P]} \quad (5-3)$$

Quando a concentração do ligante for muito maior do que a concentração dos sítios de interação com o ligante, a interação com a proteína não altera de modo significativo a concentração do ligante livre (não ligado), isto é, $[L]$ permanece constante. Essa condição se aplica amplamente à maioria dos ligantes que interagem com proteínas e simplifica a descrição do equilíbrio de ligação.

Considere, agora, o equilíbrio de ligação do ponto de vista da fração, Y (teta), dos sítios de interação com o ligante na proteína que estão ocupados pelo ligante:

$$Y = \frac{\text{sítios de ligação ocupados}}{\text{sítios de ligação total}} = \frac{[PL]}{[PL] + [P]} \quad (5-4)$$

Substituindo $K_a[L][P]$ por $[PL]$ (ver Eq. 5-3) e rearranjando os termos tem-se

$$Y = \frac{K_a[L][P]}{K_a[L][P] + [P]} = \frac{K_a[L]}{K_a[L] + 1} = \frac{[L]}{[L] + \frac{1}{K_a}} \quad (5-5)$$

O valor de K_a pode ser determinado a partir de uma curva de Y versus a concentração do ligante livre, $[L]$ (**Figura 5-4a**). Equações que têm o formato de $x = y/(y + z)$ descrevem hipérbolas, de modo que Y é uma função hiperbólica de $[L]$. A fração dos sítios de interação que é ocupada pelo ligante se aproxima assintoticamente da saturação à medida que $[L]$ aumenta. A $[L]$ na qual a metade dos sítios disponíveis está ocupada (i.e., $Y = 0,5$) corresponde a $1/K_a$.

Entretanto, é mais comum (e mais intuitivo) considerar a **constante de dissociação**, K_d , que é a recíproca de K_a ($K_d = 1/K_a$) e tem como unidade a concentração molar (M). K_d é a constante de equilíbrio para a liberação do ligante. As expressões relevantes mudam para

$$K_d = \frac{[P][L]}{[PL]} = \frac{k_d}{k_a} \quad (5-6)$$

$$[PL] = \frac{[P][L]}{K_d} \quad (5-7)$$

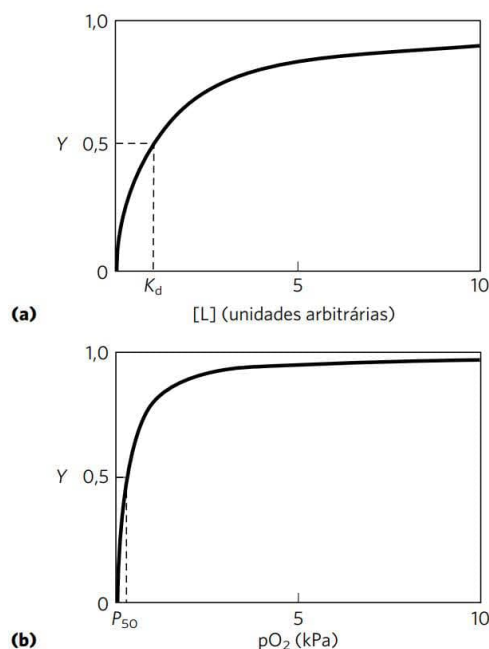
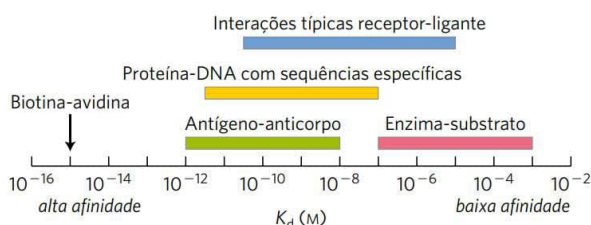


FIGURA 5-4 Representação gráfica da interação com o ligante.

A fração ocupada dos sítios de interação com o ligante, Y , está representada graficamente em função da concentração do ligante livre. Ambas as curvas são hipérbolas retangulares. **(a)** Curva hipotética para o ligante L. A $[L]$ na qual metade dos sítios de ligação está ocupada equivale a $1/K_a$, ou K_d . A curva tem uma assíntota horizontal em $Y = 1$ e uma assíntota vertical (não mostrada) em $[L] = -1/K_a$. **(b)** Curva que descreve a ligação do oxigênio à mioglobina. A pressão parcial do O_2 no ar que está acima da solução está expressa em quilopascals (kPa). O oxigênio liga-se firmemente à mioglobina com P_{50} de apenas 0,26 kPa.

TABELA 5-1 Constantes de dissociação de proteínas: alguns exemplos e faixa de valores

Proteína	Ligante	K_d (M) ^a
Avidina (clara de ovo)	Biotina	1×10^{-15}
Receptor de insulina (ser humano)	Insulina	1×10^{-10}
Imunoglobulina anti-HIV (ser humano) ^b	gp41 (proteína de superfície do HIV-1)	4×10^{-10}
Proteína que liga níquel (<i>E. coli</i>)	Ni ²⁺	1×10^{-7}
Calmodulina (rato) ^c	Ca ²⁺	3×10^{-6} 2×10^{-5}



As barras coloridas indicam as variações das constantes de dissociação típicas de várias classes de interações presentes nos sistemas biológicos. Poucas interações, como as que ocorrem entre a proteína avidina e o cofator enzimático biotina, estão dentro da faixa de variação normal. A interação biotina-avidina é tão forte que pode ser considerada irreversível. Interações de proteínas com sequência-específicas de DNA refletem proteínas que se ligam a uma determinada sequência nucleotídica no DNA, diferente das ligações gerais não específicas a qualquer sítio no DNA.

^aUma constante de dissociação é válida somente para as condições específicas da solução nas quais a constante foi medida. Os valores de K_d para uma interação proteína-ligante podem ser alterados, às vezes em várias ordens de magnitude, por mudanças na concentração salina da solução, no pH, ou ainda por outras variáveis.

^bEsta imunoglobulina foi isolada dentro dos esforços para desenvolver uma vacina contra o HIV. As imunoglobulinas (descritas adiante neste capítulo) são altamente variáveis, e a K_d indicada aqui não deve ser considerada uma característica comum a todas as imunoglobulinas.

^cA calmodulina tem quatro sítios de ligação para o cálcio. Os valores mostrados refletem os sítios de ligação com a menor e a maior afinidade observadas em um conjunto de medições.

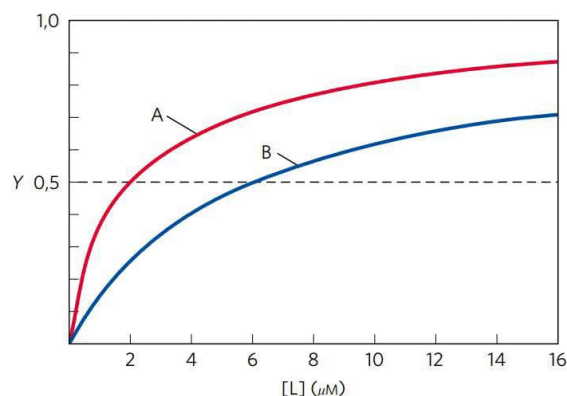
$$Y = \frac{[L]}{[L] + K_d} \quad (5-8)$$

Quando $[L]$ for igual a K_d , metade dos sítios de ligação estará ocupada. À medida que $[L]$ cai abaixo de K_d , cada vez menos proteínas terão ligantes associados. A $[L]$ deve ser nove vezes maior do que K_d para que 90% dos sítios disponíveis sejam ocupados.

Na prática, K_d é usado muito mais frequentemente do que K_a para expressar a afinidade de uma proteína por um ligante. Observe que um valor mais baixo de K_d corresponde a uma afinidade mais alta do ligante pela proteína. A matemática pode ser simplificada com as seguintes afirmações: K_d equivale à concentração molar do ligante, na qual a metade dos sítios de interação está ocupada. Nesse ponto, diz-se que a proteína alcançou a metade da saturação com relação à interação com o ligante. Quanto maior a força da interação proteica com o ligante, mais baixa será a concentração necessária do ligante para que metade dos sítios seja ocupada, e, assim, mais baixo o valor de K_d . A Tabela 5-1 mostra algumas constantes de dissociação representativas. A escala mostra variações típicas das constantes de dissociação encontradas nos sistemas biológicos.

PROBLEMA 5-1 Constantes de dissociação receptor-ligante

Duas proteínas, A e B, ligam um mesmo ligante, L, com as curvas de ligação mostradas a seguir.



Qual é a constante de dissociação, K_d , de cada proteína? Qual das duas (A ou B) tem maior afinidade pelo ligante L?

Solução: é possível determinar as constantes de dissociação pela análise do gráfico. Uma vez que Y representa a fração dos sítios de ligação ocupados pelo ligante, a concentração do ligante na qual a metade dos sítios está ocupada, ou seja, o ponto onde a curva de ligação cruza a linha em que $Y = 0,5$ é a constante de dissociação. Para A, $K_d = 2 \mu\text{M}$; para B, $K_d = 6 \mu\text{M}$. Como A está metade saturado a uma $[L]$ menor, A tem maior afinidade pelo ligante.

A ligação do oxigênio à mioglobina segue os padrões discutidos anteriormente. No entanto, como o oxigênio é um gás, é necessário fazer alguns pequenos ajustes nas equações para que os experimentos no laboratório possam ser feitos de uma maneira mais conveniente. Em primeiro lugar, substitui-se a concentração do oxigênio dissolvido por $[L]$, na Equação 5-8, obtendo-se

$$Y = \frac{[\text{O}_2]}{[\text{O}_2] + K_d} \quad (5-9)$$

Visto que, para qualquer ligante, K_d é igual a $[\text{O}_2]$ na qual a metade dos sítios de interação com o ligante está ocupada, ou $[\text{O}_2]_{0,5}$, a Equação 5-9 torna-se

$$Y = \frac{[\text{O}_2]}{[\text{O}_2] + [\text{O}_2]_{0,5}} \quad (5-10)$$

Em experimentos usando oxigênio como ligante, o que varia é a pressão parcial do oxigênio ($p\text{O}_2$) na fase gasosa sobre a solução, pois isso é mais fácil de medir do que a concentração do oxigênio dissolvido na solução. A concentração de uma substância volátil em solução é sempre proporcional à pressão parcial local do gás. Assim, definindo a pressão parcial do oxigênio em $[\text{O}_2]_{0,5}$ como P_{50} , a substituição na Equação 5-10 dá

$$Y = \frac{p\text{O}_2}{p\text{O}_2 + P_{50}} \quad (5-11)$$

A curva de ligação da mioglobina que relaciona Y com $p\text{O}_2$ está mostrada na Figura 5-4b.

A estrutura da proteína afeta a forma pela qual o ligante é ligado

A interação entre ligante e proteína quase nunca é tão simples como as equações apresentadas sugerem. A interação é muito afetada pela estrutura da proteína e geralmente é acompanhada por mudanças conformacionais. Por exemplo, a especificidade com a qual o heme interage com os diversos ligantes é alterada quando o heme está fazendo parte da mioglobina. O monóxido de carbono liga-se a moléculas de heme livre mais de 20.000 vezes melhor do que o O_2 (i.e., o K_d ou a P_{50} para ligar CO do heme livre é 20.000 vezes menor do que para O_2), porém, quando estiver fazendo parte da mioglobina, a ligação é apenas 40 vezes melhor. No caso do heme livre, a ligação forte de CO reflete diferenças nas maneiras com que a estrutura dos orbitais do CO e do O_2 interagem com Fe^{2+} . Essas mesmas estruturas dos orbitais leva a geometrias de ligação diferentes para CO e O_2 quando eles se ligam ao heme (**Figura 5-5a, b**). A mudança na afinidade relativa para CO e O_2 do heme quando ele está ligado à mioglobina é mediada pela estrutura da globina.

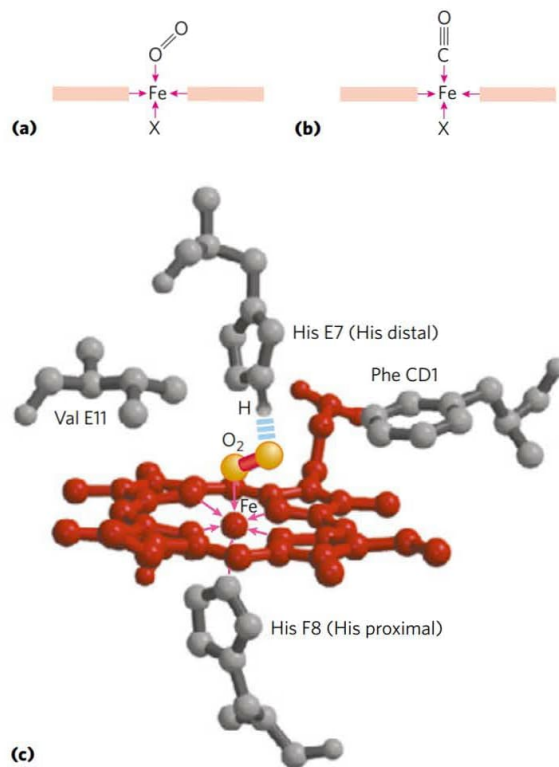


FIGURA 5-5 Efeitos estéricos causados pela interação do ligante ao heme da mioglobina. **(a)** O oxigênio liga-se ao heme com o eixo do O_2 formando um ângulo, uma conformação de ligação facilmente ajustada pela mioglobina. **(b)** O monóxido de carbono liga-se ao heme livre com seu eixo perpendicular ao plano do anel porfirínico. **(c)** Outra vista do heme da hemoglobina, mostrando o arranjo de aminoácidos-chave ao redor do heme. O O_2 fica ligado por ligações de hidrogênio com a His distal, His E7 (His⁶⁴) e isso facilita a ligação do O_2 em relação à ligação do oxigênio ao heme livre. [Fonte: (c) obtida de PDB ID 1MBO, S. E. Phillips, *J. Mol. Biol.* 142:531, 1980.]

Quando o heme está ligado à mioglobina, a sua afinidade por O_2 aumenta seletivamente devido à presença da **His distal** (His⁶⁴, ou His E7 da mioglobina). O complexo Fe-O_2 é muito mais polar que o complexo Fe-CO . Há uma carga negativa parcial que se distribui através dos átomos de oxigênio do O_2 que está ligado devido à oxidação parcial dos átomos de ferro. Uma ligação de hidrogênio entre o imidazol da cadeia lateral da His E7 e o O_2 ligado estabiliza eletrostaticamente este complexo polar (Figura 5-5c). Isso faz a afinidade da mioglobina por O_2 aumentar por um fator de 500; esse efeito não existe para a ligação Fe-CO na mioglobina. Como consequência, a afinidade 20.000 vezes maior da ligação do heme por CO em relação a O_2 diminui cerca de 40 vezes quando o heme está incrustado na mioglobina. Esse efeito eletrostático favorável na ligação do O_2 é ainda mais dramático em algumas hemoglobinas de invertebrados, onde dois grupos do bolsão de ligação podem formar ligações de hidrogênio mais fortes com o O_2 e o grupo heme liga O_2 com afinidade maior do que liga CO. Esse aumento seletivo da afinidade por O_2 nas globinas é fisiologicamente importante e ajuda a evitar o envenenamento por CO gerado pelo catabolismo do heme (ver Capítulo 22) e por outros fatores.

A ligação do O_2 ao heme da mioglobina também depende dos movimentos moleculares, ou “respirações”, na estrutura da proteína. A molécula de heme está profundamente enterrada no polipeptídeo enovelado, sem um caminho direto para o trânsito do oxigênio da solução circundante para o sítio de interação com o ligante. Se a proteína fosse rígida, o O_2 não poderia entrar ou sair com facilidade do bolsão do heme. Entretanto, a flexibilização molecular rápida das cadeias laterais dos aminoácidos gera cavidades transitórias na estrutura da proteína, e o O_2 entra e sai, movendo-se através dessas cavidades. Simulações em computador de flutuações estruturais rápidas na mioglobina sugerem que existem muitas dessas vias. A His distal age como uma porta que controla o acesso ao principal bolsão, que fica próximo do ferro do heme. A rotação desse resíduo de His, abrindo e fechando o bolsão, ocorre em uma escala de tempo de nanossegundos (10^{-9} s). Mesmo mudanças conformacionais sutis podem ser fundamentais para a atividade da proteína.

Em outras globinas, a His distal funciona de maneira diferente. Na neuroglobina, na citoglobina e em algumas globinas de plantas e invertebrados, a His distal é coordenada diretamente com o ferro do heme no local onde o ligante se liga. Nessas globinas, o O_2 ou um outro ligante devem deslocar a His distal durante o processo de ligação e, após ocorrer a ligação, uma nova ligação de hidrogênio é novamente formada entre a His distal e o O_2 .

A hemoglobina transporta oxigênio no sangue

Quase todo o oxigênio transportado pelo sangue em animais está ligado à hemoglobina, sendo que ela está nos eritrócitos (glóbulos vermelhos). Os eritrócitos humanos normais são pequenos discos bicôncavos (6 a 9 μm de diâmetro), formados a partir de células-tronco precursoras, chamadas de **hemocitoblastos**. No processo de maturação, a célula-tronco produz células-filhas, que produzem grandes quantidades de hemoglobina e, em seguida, perdem as organelas intracelulares – núcleo, mitocôndrias e retículo endoplasmático. Os eritrócitos são, portanto, células incompletas, vestígios de células, incapazes de se reproduzir e, no ser humano, destinadas a viver por somente 120 dias. A sua principal função é carregar hemoglobina dissolvida no citosol em concentração muito alta (~ 34% do peso total).

A hemoglobina está cerca de 96% saturada com oxigênio no sangue arterial que passa dos pulmões ao coração e daí até os tecidos periféricos. No sangue venoso que retorna ao coração, ela está somente cerca de 64% saturada. Assim, cada 100 mL de sangue que banha um tecido libera um terço do oxigênio que transporta, ou 6,5 mL de O_2 gasoso, na pressão atmosférica e na temperatura corporal.

A mioglobina, com sua curva hiperbólica de ligação ao oxigênio (Figura 5-4b), é relativamente insensível a pequenas alterações na concentração do oxigênio dissolvido e, por isso, funciona bem como proteína de armazenamento de oxigênio. A hemoglobina, com suas várias subunidades e sítios de ligação para o O_2 , é mais adequada para o transporte do oxigênio. Conforme será visto, as interações entre as subunidades de uma proteína multimérica permitem uma resposta altamente sensível a pequenas alterações na concentração do ligante. Interações entre as subunidades da hemoglobina causam mudanças conformacionais que

alteram a afinidade da proteína pelo oxigênio. A modulação da ligação do oxigênio permite que a proteína de transporte de O_2 responda a alterações na demanda de oxigênio pelos tecidos.

As subunidades da hemoglobina têm estrutura semelhante à da mioglobina

A hemoglobina (M_r 64.500; abreviada Hb) é aproximadamente esférica, com diâmetro ao redor de 5,5 nm. Ela é uma proteína tetramérica que contém quatro grupos prostéticos heme, cada um associado a uma cadeia polipeptídica. A hemoglobina do adulto contém dois tipos de globina, duas cadeias α (141 resíduos de aminoácidos cada uma) e duas cadeias β (146 resíduos cada uma). Apesar de menos da metade dos resíduos de aminoácidos ser idêntica entre as sequências polipeptídicas das subunidades α e β , a estrutura tridimensional dos dois tipos de subunidades é muito semelhante. Ainda, a estrutura é muito semelhante à da mioglobina (Figura 5-6), apesar de a sequência de aminoácidos dos três polipeptídeos ser idêntica apenas em 27 posições (Figura 5-7). Esses três polipeptídeos são membros da família proteica das globinas. A convenção para a denominação das hélices, descrita para a mioglobina, também se aplica para os polipeptídeos da hemoglobina, exceto pelo fato de a subunidade α não ter a hélice curta D. O bolsão de ligação ao heme é composto na sua maior parte pelas hélices E e F de cada uma das subunidades.

A estrutura quaternária da hemoglobina apresenta interações fortes entre as subunidades diferentes. Mais de 30 resíduos participam da interface $\alpha_1\beta_1$ (o mesmo ocorre com a interface $\alpha_2\beta_2$ correspondente). A interação entre esses resíduos é forte o suficiente para que, mesmo que tratamentos brandos com ureia tendam a dissociar o tetramero nos dois dímeros $\alpha\beta$, estes se mantêm intactos. A interface $\alpha_1\beta_2$ (e a interface $\alpha_2\beta_1$) envolve 19 resíduos (Figura 5-8). O efeito hidrofóbico desempenha um papel central na estabilização dessas interfaces, mas também há participação de muitas ligações de hidrogênio e alguns pares iônicos (ou pontes salinas), cujas importâncias serão discutidas a seguir.

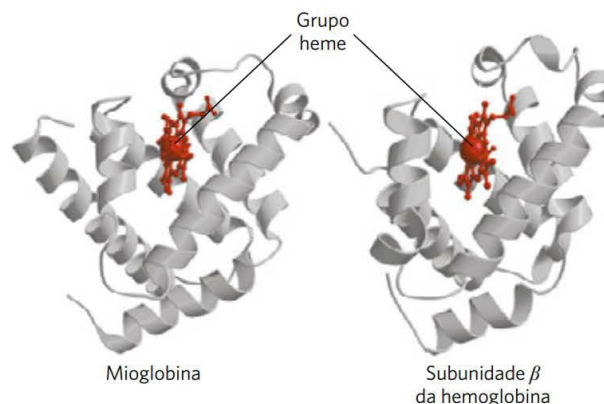


FIGURA 5-6 Comparação entre a estrutura da mioglobina e a estrutura da subunidade β da hemoglobina. [Fontes: (à esquerda) PDB ID 1MBO, S. E. Phillips, *J. Mol. Biol.* 142:531, 1980. (À direita) Obtida de PDB ID 1HGA, R. Liddington et al., *J. Mol. Biol.* 228:551, 1992.]

	Mb	Hb α	Hb β
NA1	1V	1V	1V
	L	L	L
A1	S	S	T
	E	P	P
	G	A	E
	E	D	E
	W	K	K
	Q	T	S
	L	N	A
	V	V	V
	L	K	T
	H	A	L
	V	A	L
	W	W	W
	A	G	G
	K	K	K
	V	V	V
A16	E	G	---
	A	A	---
B1	20D	20H	N
	V	A	20V
	A	G	D
	G	E	E
	H	Y	V
	G	G	G
	Q	A	G
	D	E	A
	I	A	E
	L	L	L
	I	E	G
	R	R	R
	L	M	L
	F	F	L
	K	L	V
B16	S	S	V
C1	H	F	Y
	P	P	P
	E	T	W
	T	T	T
	40L	40K	40R
	E	T	Y
C7	K	Y	---
	F	F	F
	D	P	E
	R	H	S
	F	F	F
	K	---	G
	H	D	D
	L	L	L
	K	S	S
D1	T	H	T
	E	---	P
	A	---	D
	E	---	A
	M	---	V
	K	---	M
D7	A	G	G
E1	S	S	N
	E	A	P
	60D	Q	K
	L	V	60V
	K	K	K
	K	G	A
	V	H	H
	G	G	G
	V	V	V
	T	K	K
	V	V	V
	L	A	L
	T	D	G
	A	A	A
	L	L	F
	G	T	S
	A	N	D
	I	A	G
E19	L	V	L

FIGURA 5-7 Sequência de aminoácidos da mioglobina de baleia e das cadeias α e β da hemoglobina humana. As linhas tracejadas marcam os limites das hélices. Para otimizar o alinhamento, pequenas lacunas tiveram que ser introduzidas nas duas sequências da Hb, onde as sequências usadas na comparação possuem aminoácidos. Com exceção da falta da hélice D na cadeia α da Hb (Hb α), esse alinhamento permite usar todo o conjunto de letras da convenção e enfatizar as posições dos resíduos de aminoácidos idênticas em todas as três estruturas. Os resíduos sombreados em vermelho são conservados em todas as globinas conhecidas. Observe que a designação de letras e números das hélices para os aminoácidos não corresponde necessariamente a uma posição comum na sequência linear de aminoácidos nos polipeptídeos. Por exemplo, o resíduo His distal é o resíduo His E7 nas três estruturas, mas corresponde aos resíduos His⁶⁴, His⁵⁸ e His⁶³ na sequência da Mb, da α Hb e da β Hb, respectivamente. Os resíduos não helicoidais nas extremidades carboxila e amino, além do primeiro (A) e do último (H) segmentos α -helicoidais, são marcados com NA e HC, respectivamente.

	Mb	Hb α	Hb β
	K	A	A
	K	H	A
	K	V	L
	80G	D	D
	H	M	L
	H	E	K
	A	N	G
	E	A	T
F1	L	80L	F
	K	S	A
	P	A	T
	L	L	L
	A	S	S
	Q	D	E
	S	L	L
	H	H	H
His proximal	F8	A	C
F9	A	A	C
	K	K	K
	H	L	L
	K	R	H
	I	V	V
G1	100P	D	D
	I	P	100P
	K	V	E
	I	N	N
	L	F	F
	E	K	R
	F	L	L
	I	L	L
	I	L	L
	H	V	C
	V	T	V
	L	L	L
	H	A	A
	S	A	H
G19	R	H	H
	H	L	F
	120P	P	G
	G	A	120K
	D	E	E
	F	F	F
H1	G	T	T
	A	P	P
	D	120A	P
	A	V	V
	Q	H	Q
	A	A	A
	M	L	Y
	N	D	Q
	K	K	K
	A	F	V
	L	L	V
	E	A	A
	L	S	G
	F	V	V
	R	S	A
	140K	T	N
	D	V	140A
	I	L	L
	A	T	A
H21	A	S	H
	K	K	K
	Y	140Y	Y
	K	141R	146H
	E	---	HC3
H26	---	---	---
	G	---	---
	Y	---	---
	Q	---	---
	153G	---	---

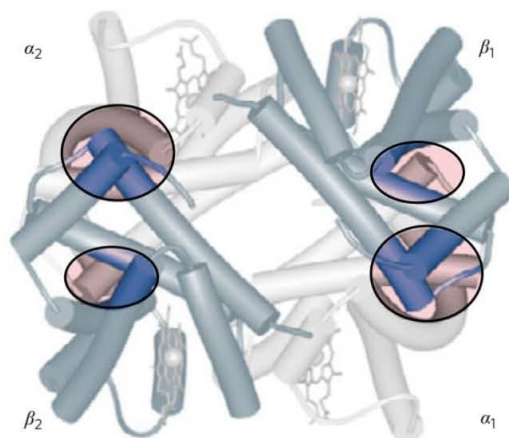


FIGURA 5-8 Interações dominantes entre as subunidades da hemoglobina. As subunidades α estão em cor mais clara, e as subunidades β , em cor mais escura. As interações mais fortes (destacadas) ocorrem entre subunidades diferentes. Quando o oxigênio se liga, a modificação nos contatos $\alpha_1\beta_1$ é pequena, mas o contato $\alpha_1\beta_2$ se modifica bastante, incluindo a quebra de vários pares iônicos. [Fonte: PDB ID 1HGA, R. Liddington et al., *J. Mol. Biol.* 228:551, 1992.]

A hemoglobina sofre mudança estrutural quando se liga ao oxigênio

A análise por raios X revelou duas conformações principais da hemoglobina: o **estado R** e o **estado T**. Embora o oxigênio se ligue à hemoglobina nos dois estados, ele tem muito mais afinidade pela hemoglobina no estado R. A ligação com oxigênio estabiliza o estado R. Experimentalmente, quando o oxigênio não está presente, o estado T é mais estável, e, assim, é a conformação predominante da **desoxi-hemoglobina**. T e R foram usados originalmente para “tenso” e “relaxado”, respectivamente, uma vez que o estado T é estabilizado por um grande número de pares iônicos, muitos deles situados na interface $\alpha_1\beta_2$ (e na interface $\alpha_2\beta_1$) (**Figura 5-9**). A ligação do O_2 à subunidade da hemoglobina no estado T desencadeia uma mudança na conformação para o estado R. Quando toda a proteína sofre essa transição, a estrutura das subunidades individuais se altera pouco, mas os pares de subunidades $\alpha\beta$ deslizam um sobre o outro e sofrem uma rotação, deixando o bolsão entre as subunidades β mais estreito (**Figura 5-10**). Nesse processo, alguns dos pares iônicos que estabilizam o estado T são rompidos e são formados outros pares iônicos.

Max Perutz propôs que a transição T \rightarrow R é desencadeada por mudanças na posição de cadeias laterais de aminoácidos-chave que circundam o heme. No estado T, a porfirina é levemente pregueada, fazendo o ferro do heme projetar-se um pouco para o lado da His proximal (His F8). A ligação do O_2 faz o heme assumir uma posição mais planar, deslocando a posição da His proximal e da hélice F ligada (**Figura 5-11**). Essas mudanças levam a um ajuste nos pares iônicos da interface $\alpha_1\beta_2$.

A hemoglobina liga-se ao oxigênio de forma cooperativa

A hemoglobina deve se ligar com eficiência ao oxigênio nos pulmões – onde a pO_2 é cerca de 13,3 kPa – e liberá-lo nos

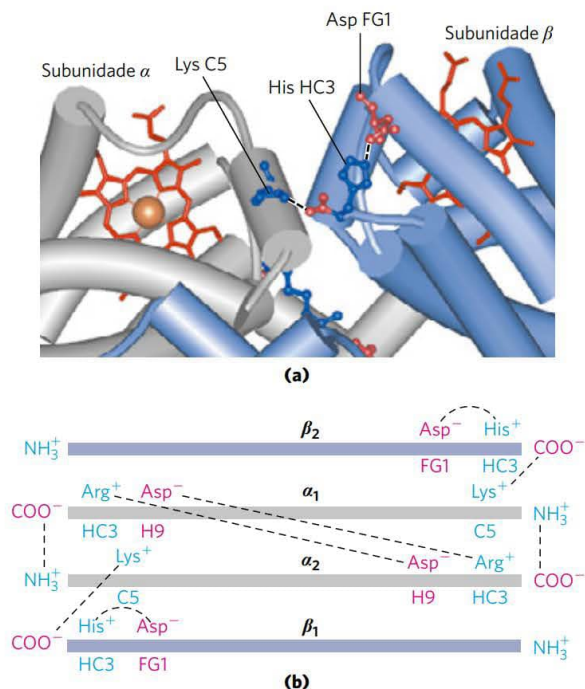


FIGURA 5-9 Certos pares iônicos estabilizam o estado T da desoxi-hemoglobina. (a) Visão aumentada de uma porção da molécula de desoxi-hemoglobina no estado T. Interações entre os pares iônicos His HC3 e Asp FG1 da subunidade β (em azul) e entre Lys C5 da subunidade α (em cinza) e His HC3 (o grupo α -carboxílico) da subunidade β estão pontilhadas. (Lembre-se que HC3 é o resíduo carboxiterminal da subunidade β .) (b) As interações entre esses pares iônicos e entre outros não mostrados em (a) estão esquematizadas nesta representação das cadeias polipeptídicas estendidas da hemoglobina. [Fonte: (a) PDB ID 1HGA, R. Liddington et al., *J. Mol. Biol.* 228:551, 1992.]

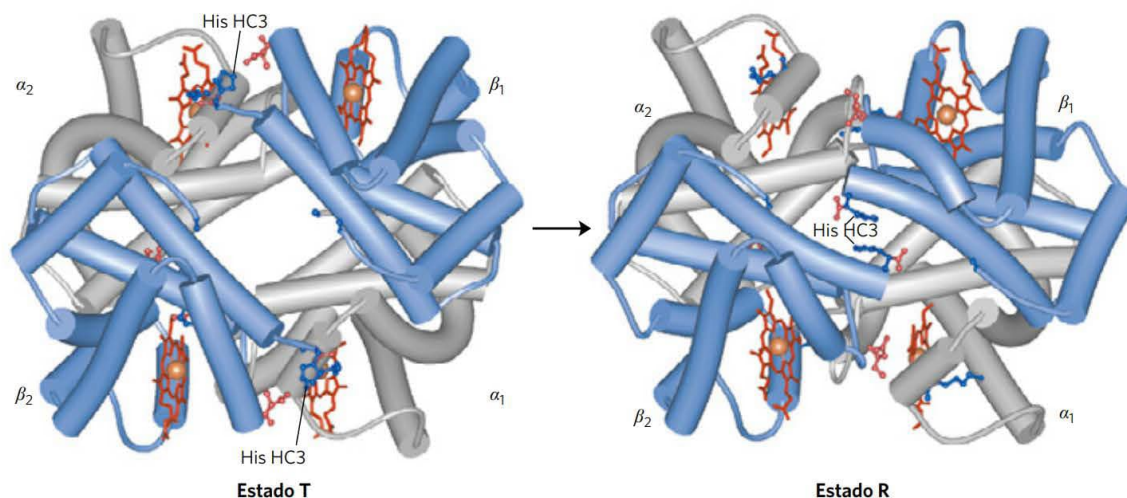


FIGURA 5-10 A transição T \rightarrow R. Nestes esquemas da desoxi-hemoglobina, como no da Figura 5-9, as subunidades β estão mostradas em azul, e as subunidades α , em cinza. Cadeias laterais carregadas positivamente e o terminal de cadeia envolvidos em pares iônicos estão mostrados em azul, e as cadeias correspondentes com carga negativas estão mostradas em vermelho. A Lys C5 de cada subunidade α e o Asp FG1 de cada subunidade β estão visíveis, mas não estão marcados (comparar com a Figura 5-9a). Observe que a molécula está com orientação ligeiramente diferente da mostrada na Figura 5-9. A transição do estado T para o estado R altera de modo considerável os pares de subunidades, afetando determinados pares iônicos. Mais perceptivelmente, os resíduos de His HC3 na extremidade carboxiterminal das subunidades β que, no estado T, estão envolvidos em pares iônicos, no estado R sofrem rotação em direção ao centro da molécula e já não estão mais formando pares iônicos. Outro resultado significativo da transição T \rightarrow R é um estreitamento do bolsão entre as subunidades β . [Fontes: Estado T: PDB ID 1HGA, R. Liddington et al., *J. Mol. Biol.* 228:551, 1992. Estado R: PDB ID 1BBB, M. M. Silva et al., *J. Biol. Chem.* 267:17.248, 1992.]

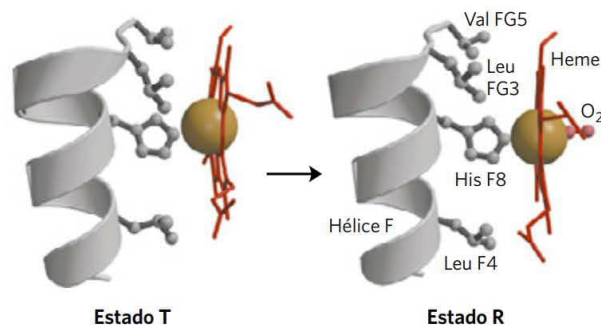


FIGURA 5-11 Mudanças na conformação nas proximidades do heme quando o O_2 liga-se à desoxi-hemoglobina. A alteração na posição da hélice F quando o heme liga O_2 ocorre por meio de um ajuste que dispara a transição T \rightarrow F. [Fontes: Estado T: obtida a partir de PDB ID 1HGA, R. Liddington et al., *J. Mol. Biol.* 228:551, 1992. Estado R: obtida a partir de PDB ID 1BBB, M. M. Silva et al., *J. Biol. Chem.* 267:17.248, 1992; Estado R modificado para representar O_2 no lugar de CO .]

tecidos, onde a pO_2 é de 4 kPa. A mioglobina, ou qualquer proteína que se ligue ao oxigênio com uma curva de ligação hiperbólica, é mal adaptada para essa função, pelo motivo ilustrado na **Figura 5-12**. Uma proteína que se ligue ao O_2 com alta afinidade capta oxigênio de maneira eficiente nos pulmões, mas não o libera muito nos tecidos. Por sua vez, se a proteína se ligue ao oxigênio com afinidade suficientemente baixa para liberá-lo nos tecidos, ela não o capta muito nos pulmões.

A hemoglobina resolve o problema passando por uma transição de um estado de baixa afinidade (o estado T) para um de alta afinidade (o estado R) à medida que mais moléculas de O_2 vão sendo ligadas. Como resultado, a hemoglobina tem uma curva de ligação ao oxigênio híbrida em

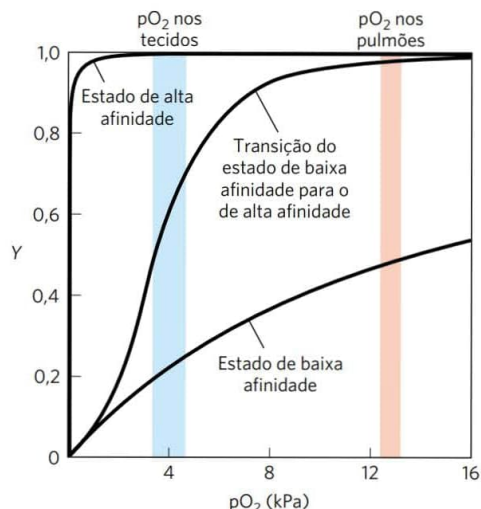


FIGURA 5-12 Curva sigmoide de ligação (cooperativa). A curva sigmoide de ligação pode ser vista como uma curva híbrida que reflete a transição de um estado de baixa afinidade para um de alta afinidade. Devido a essa ligação cooperativa, evidenciada por uma curva sigmoide, a hemoglobina é mais sensível às pequenas diferenças na concentração de O_2 entre os tecidos e os pulmões, o que lhe permite ligar oxigênio nos pulmões (onde a pO_2 é alta) e liberá-lo nos tecidos (onde a pO_2 é baixa).

forma de S, ou sigmoide (Figura 5-12). Proteínas com uma única cadeia polipeptídica com um único sítio de ligação não geram uma curva de ligação sigmoide – mesmo se a ligação produzir uma mudança de conformação – porque cada molécula do ligante interage de modo independente e não afeta a ligação com outra molécula. Em contrapartida, a ligação do O_2 às subunidades individuais da hemoglobina pode alterar a afinidade nas subunidades adjacentes. A primeira molécula de O_2 que interage com a desoxi-hemoglobina o faz fracamente, pois se liga a uma subunidade no estado T. Essa ligação, entretanto, leva a mudanças conformacionais que se transferem às subunidades adjacentes, facilitando a ligação de moléculas adicionais de O_2 . De fato, a transição $T \rightarrow R$ ocorre mais facilmente na segunda subunidade depois da ligação do O_2 à primeira subunidade. A última (quarta) molécula de O_2 se liga ao heme de uma subunidade que já está no estado R, e, por isso, se liga com afinidade muito mais alta do que a primeira.

Uma **proteína alostérica** é aquela em que a interação com um ligante em um sítio afeta as propriedades de ligação de outro sítio na mesma proteína. O termo “alostérico” deriva do grego *allos*, “outro”, e *stereos*, “sólido” ou “forma”. Proteínas alostéricas são as que têm “outras formas”, ou conformações, induzidas pela interação com ligantes denominados **moduladores**. A mudança conformacional induzida pelo(s) modulador(es) converte formas mais ativas em menos ativas da proteína e vice-versa. Os moduladores das proteínas alostéricas podem ser inibidores ou ativadores. Quando o ligante normal e o modulador são idênticos, a interação é chamada de **homotrópica**. Quando o modulador é uma molécula diferente do ligante normal, a interação é chamada de **heterotrópica**. Algumas proteínas têm dois ou mais moduladores e, em função disso, podem participar de interações homotrópicas e heterotrópicas.

A interação cooperativa de um ligante com uma proteína multimérica, como observado com a ligação do O_2 à hemoglobina, é uma forma de ligação alostérica. A interação de um ligante afeta a afinidade de qualquer sítio de ligação ainda não ocupado, e o O_2 pode ser considerado como ligante e modulador homotrópico ativador. Existe apenas um sítio de ligação para o O_2 em cada subunidade, de forma que os efeitos alostéricos que dão origem à cooperatividade são mediados por mudanças conformacionais transmitidas de uma subunidade à outra por interações subunidade-subunidade. Uma curva sigmoide é sinal de ligação cooperativa. Ela permite uma resposta muito mais sensível à concentração do ligante, sendo importante para a função de muitas proteínas multiméricas. O princípio da alosteria também se aplica às enzimas reguladoras, como será visto no Capítulo 6.

As mudanças conformacionais cooperativas dependem de variações na estabilidade estrutural de diferentes partes da proteína, conforme descrito no Capítulo 4. Os sítios de ligação de uma proteína consistem em segmentos estáveis próximos a segmentos relativamente instáveis, sendo os últimos capazes de mudanças frequentes na conformação ou de desordem intrínseca (Figura 5-13). No momento da interação com o ligante, as partes móveis do sítio de ligação na proteína devem ser estabilizadas em uma conformação particular, afetando a conformação das subunidades polipeptídicas adjacentes. Se o sítio de ligação como um todo fosse altamente estável, poucas mudanças estruturais ocorreriam nesse sítio ou seriam propagadas para outras partes da proteína após a interação com o ligante.

Como no caso da mioglobina, outros ligantes, além do oxigênio, podem interagir com a hemoglobina. O monóxido de carbono é um exemplo importante. Ele liga-se à hemoglobina 250 vezes melhor do que o oxigênio (a ligação de hidrogênio crítica entre o O_2 e a His distal não é suficientemente forte na hemoglobina humana como é na maioria das mioglobinas e dos mamíferos, de modo que a ligação com O_2 não é suficientemente aumentada em relação ao CO). A exposição humana ao CO pode ter consequências trágicas (Quadro 5-1).

A interação cooperativa do ligante pode ser descrita em termos quantitativos

A ligação cooperativa do oxigênio com a hemoglobina foi analisada pela primeira vez por Archibald Hill, em 1910. Desse trabalho, surgiu a abordagem geral para o estudo da interação cooperativa de ligantes com proteínas multiméricas.

Para uma proteína com n sítios de ligação, o equilíbrio da Equação 5-1 torna-se



e a expressão para a constante de associação torna-se

$$K_a = \frac{[PL_n]}{[P][L]^n} \quad (5-13)$$

A expressão de Y (ver Equação 5-8) é

$$Y = \frac{[L]^n}{[L]^n + K_d} \quad (5-14)$$

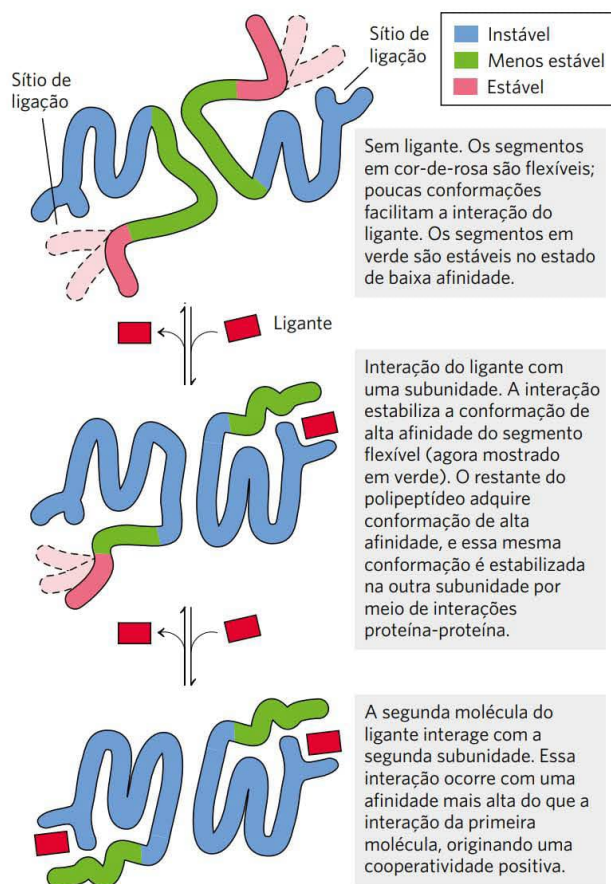


FIGURA 5-13 Mudanças estruturais em uma proteína multimérica no processo de interação cooperativa com o ligante. A estabilidade estrutural não é uniforme em toda a molécula da proteína. A figura mostra uma proteína dimérica hipotética, com regiões de alta (em azul), média (em verde) e baixa (em cor-de-rosa) estabilidade. Os sítios de interação com o ligante são formados por segmentos de alta e baixa estabilidade, de forma que a afinidade pelo ligante é relativamente baixa. As mudanças conformacionais que acontecem em decorrência da interação com o ligante transformam a proteína de um estado de baixa afinidade para um de alta afinidade, uma forma de encaixe induzido.

Rearranjando e então tomando o log de ambos os lados resulta em

$$\frac{Y}{1-Y} = \frac{[L]^n}{K_d} \quad (5-15)$$

$$\log \left(\frac{Y}{1-Y} \right) = n \log [L] - \log K_d \quad (5-16)$$

em que $K_d = [L]_{0,5}^n$

A equação 5-16 é a **equação de Hill**, e o gráfico de $\log [Y/(1-Y)]$ versus $\log [L]$ é denominado **curva de Hill**. Com base na equação, a curva de Hill deveria ter uma inclinação de n . Entretanto, a inclinação determinada experimentalmente na verdade não reflete o número de sítios de ligação, mas o grau de interação entre eles. A inclinação de uma curva de Hill é, por isso, denominada n_H , o **coeficiente de Hill**, que é a medida do grau de cooperatividade. Se n_H

for igual a 1, a interação com o ligante não é cooperativa, situação que pode surgir mesmo em uma proteína multimérica se as subunidades não se comunicam. Um n_H maior que 1 indica cooperatividade positiva. Essa é a situação observada na hemoglobina, na qual a interação com uma molécula do ligante facilita a interação de outras. O limite superior teórico para n_H é alcançado quando $n_H = n$. Nesse caso, a ligação é completamente cooperativa: todos os sítios de ligação na proteína estão ocupados com os ligantes simultaneamente e, nessas condições, nenhuma proteína está parcialmente saturada. Esse limite nunca é alcançado na prática, e o valor de n_H é sempre menor do que o número real de sítios de ligação na proteína.

Um n_H menor que 1 indica cooperatividade negativa, na qual a interação de uma molécula de ligante *impede* a interação de outras moléculas ligantes. São raros os casos bem documentados de cooperatividade negativa.

Para adaptar a equação de Hill à ligação do oxigênio com a hemoglobina é preciso substituir novamente pO_2 por $[L]$ e P_{50} por K_d :

$$\log \left(\frac{Y}{1-Y} \right) = n \log pO_2 - n \log P_{50} \quad (5-17)$$

As curvas de Hill para a mioglobina e a hemoglobina estão apresentadas na **Figura 5-14**.

Dois modelos que propõem mecanismos para a ligação cooperativa

Os bioquímicos têm hoje muitas informações sobre os estados T e R da hemoglobina, mas muito ainda permanece para ser estudado sobre como ocorre a transição $T \rightarrow R$. Dois modelos para a interação cooperativa de ligantes a proteínas com múltiplos sítios de ligação têm influenciado muito as considerações sobre esse problema.

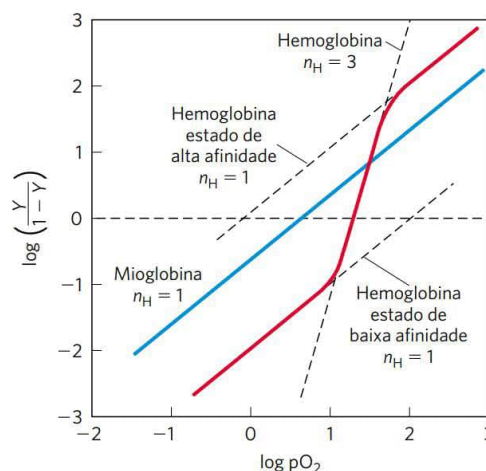


FIGURA 5-14 Curvas de Hill para a ligação do oxigênio à mioglobina e à hemoglobina. Quando $n_H = 1$, não há evidência de cooperatividade. O maior grau de cooperatividade observado para a hemoglobina corresponde a aproximadamente $n_H = 3$. Embora isso indique um alto grau de cooperatividade, n_H é menor que n , o número de sítios de ligação para O_2 que a hemoglobina tem. Isso é normal para uma proteína que exhibe comportamento alostérico de ligação.

QUADRO 5-1



MEDICINA

Monóxido de carbono: um assassino furtivo

Lago Powell, Arizona, agosto de 2000. Uma família estava aproveitando as férias em uma casa-barco alugada quando o gerador de eletricidade foi ligado para fazer funcionar um aparelho de ar-condicionado e um televisor. Quinze minutos mais tarde, dois irmãos, com 8 e 11 anos, pularam do convés da popa para nadar. A abertura do exaustor do gerador estava situada imediatamente abaixo do convés, espaço onde os dois foram nadar. Em dois minutos, os dois meninos foram envolvidos pelo monóxido de carbono que havia se concentrado no espaço abaixo do convés. Os dois se intoxicaram e morreram afogados. Essas mortes, juntamente com uma série de outras mortes ocorridas na década de 1990, também ligadas a casas-barco de modelo semelhante, levaram por fim ao recolhimento desse modelo de casa-barco e a modificações no exaustor do gerador.

O monóxido de carbono (CO), gás incolor e inodoro, é responsável por mais da metade das mortes anuais por envenenamento no mundo. Como ele tem uma afinidade pela hemoglobina 250 vezes maior do que a do oxigênio, níveis relativamente baixos de CO podem ter efeitos substanciais e trágicos. O complexo formado pela ligação do CO à hemoglobina é chamado de carboxi-hemoglobina, ou COHb.

Um pouco do CO é produzido por processos naturais, mas altos níveis localizados geralmente são o resultado de atividade humana. Motores e estufas são fontes importantes, já que o CO é um subproduto da combustão incompleta de combustíveis fósseis. Somente nos Estados Unidos, cerca de 4 mil pessoas morrem por envenenamento por CO por ano, de modo acidental ou intencional. Muitas das mortes acidentais envolvem a produção não detectada de CO em ambientes fechados, por mau funcionamento ou vazamento de estufas domésticas, liberando a substância dentro de casa. No entanto, o envenenamento também pode ocorrer em espaços abertos, quando pessoas desavisadas inalam o CO do escapamento de geradores, motores de popa, motores de tratores, veículos de recreação ou cortadores de grama.

Os níveis de CO na atmosfera raramente são perigosos, variando de menos de 0,05 parte por milhão (ppm) em áreas não habitadas e remotas até 3 a 4 ppm em algumas cidades do hemisfério norte. Nos Estados Unidos, o limite de CO determinado pelo governo (Occupational Safety and Health Administration [OSHA]) em locais de trabalho é de 50 ppm por pessoa por turno de oito horas. A forte ligação do CO à hemoglobina faz a COHb se

acumular ao longo do tempo, quando as pessoas ficam expostas a uma fonte constante e de baixo nível de CO.

Em média, em pessoas saudáveis, menos de 1% da hemoglobina total está complexada como COHb. Uma vez que o CO é um produto da fumaça do tabaco, muitos fumantes têm níveis de COHb na faixa de 3 a 8% do total da hemoglobina, podendo aumentar para 15% nos fumantes inveterados. Os níveis de COHb equilibram-se em 50% nas pessoas que respiram ar contendo 570 ppm de CO por várias horas. Métodos confiáveis foram desenvolvidos para relacionar o conteúdo de CO na atmosfera com os níveis de COHb no sangue (Figura Q-1). Testes com casas-barco com escapamento do gerador semelhante ao responsável pelas mortes no Lago Powell mostraram que os níveis de CO sob o convés alcançam de 6.000 a 30.000 ppm, e os níveis de O₂ ficam reduzidos de 21 para 12% no mesmo local. Mesmo acima do convés foram detectados níveis de CO de 7.200 ppm, suficientemente altos para causar morte em poucos minutos.

Como uma pessoa é afetada pela COHb? Raramente aparecem sintomas quando os níveis são menores do que 10% do total de hemoglobina. Em 15%, o indivíduo sente dor de cabeça leve. Entre 20 a 30%, a dor de cabeça é forte e geralmente acompanhada por náusea, tontura, confusão, desorientação e alguns distúrbios visuais; es-

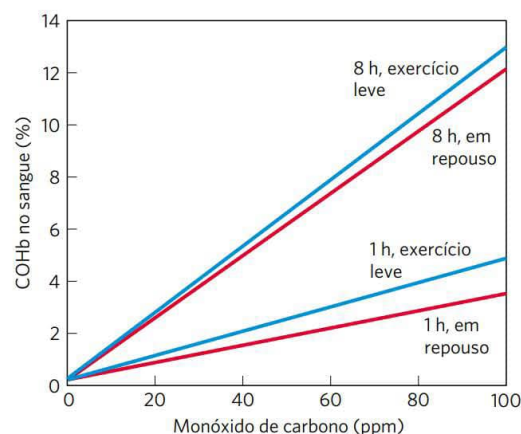


FIGURA Q-1 Relação entre os níveis de COHb no sangue e a concentração de CO no ar ambiente. Quatro condições diferentes estão mostradas, comparando os efeitos de exposição breve *versus* exposição prolongada e exposição em repouso *versus* exposição durante exercício leve. [Fonte: dados de R. F. Coburn et al., *J. Clin. Invest.* 44:1899, 1965.]

O primeiro modelo foi proposto por Jacques Monod, Jeffries Wyman e Jean-Pierre Changeux, em 1965, sendo chamado de **modelo MWC** ou **modelo combinado** (Figura 5-15a). Esse modelo supõe que as subunidades de uma proteína de ligação cooperativa são funcionalmente idênticas, que cada subunidade pode existir em (pelo menos) duas conformações e que todas as subunidades sofrem transição de uma conformação para a outra simultaneamente. Nesse modelo, nenhuma das subunidades da proteína está em con-

formação diferente. As duas conformações estão em equilíbrio. O ligante pode se ligar a qualquer das conformações, mas se liga muito mais fortemente ao estado R. A ligação sucessiva das moléculas do ligante à conformação de baixa afinidade (mais estável na ausência do ligante) torna mais provável a transição para a conformação de alta afinidade.

No segundo modelo, o **modelo sequencial** (Figura 5-15b), proposto em 1966 por Daniel Koshland e colaboradores, a interação com o ligante pode induzir uma mudança

ses sintomas costumam ser reversíveis pelo tratamento com oxigênio. Em níveis de COHb de 30 a 50%, os sintomas neurológicos tornam-se mais graves, e em níveis próximos de 50%, o indivíduo perde a consciência e pode entrar em coma. Pode seguir-se de deficiência respiratória. Com a exposição prolongada, alguns danos se tornam permanentes. Normalmente, ocorre morte quando os níveis de COHb ultrapassam 60%. A necropsia nos meninos que morreram no Lago Powell revelou níveis de COHb de 59 e 52%.

A ligação do CO à hemoglobina é afetada por muitos fatores, incluindo o exercício (Figura Q-1) e mudanças na pressão atmosférica relacionadas com a altitude. Devido aos seus níveis basais de COHb mais altos, os fumantes expostos a uma fonte de CO geralmente apresentam sintomas mais rapidamente do que os não fumantes. Os indivíduos com doenças cardíacas, pulmonares ou sanguíneas que tiverem uma disponibilidade do oxigênio nos tecidos reduzida também podem apresentar sintomas em níveis mais baixos de exposição ao CO. Os fetos são particularmente mais suscetíveis ao risco de envenenamento por CO, pois a hemoglobina fetal tem uma afinidade pelo CO um pouco mais alta do que a hemoglobina do adulto. Têm sido relatados casos de exposição ao CO nos quais o feto morre, mas a mãe sobrevive.

Parece surpreendente que a perda da metade da hemoglobina para a COHb possa ser fatal, pois se sabe que as pessoas com qualquer uma das várias condições de anemia conseguem viver razoavelmente bem com metade do total de hemoglobina ativa. No entanto, a ligação do CO faz mais do que remover a proteína do reservatório disponível para se ligar ao oxigênio. Ela também afeta a afinidade pelo oxigênio das subunidades remanescentes da hemoglobina. Quando o CO se liga a uma ou duas subunidades do tetrâmero da hemoglobina, a afinidade pelo O_2 é substancialmente aumentada nas subunidades restantes (Figura Q-2). Assim, o tetrâmero com duas moléculas de CO pode ligar O_2 de modo eficiente nos pulmões, mas libera muito pouco nos tecidos. A privação do oxigênio nos tecidos se agrava rapidamente. Para aumentar o problema, os efeitos do CO não estão limitados à interferência com a função da hemoglobina. O CO liga-se a outras hemoproteínas e a uma grande variedade de metaloproteínas. As consequências dessas interações ainda não estão bem explicadas, mas podem ser responsáveis por alguns dos efeitos de longo prazo do envenenamento agudo, mas não fatal, por CO.

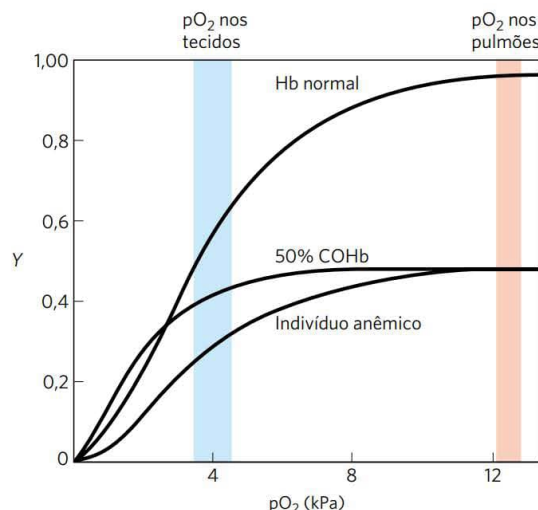


FIGURA Q-2 Várias curvas de ligação do oxigênio: para hemoglobina normal, para hemoglobina de um indivíduo anêmico com somente 50% de sua hemoglobina funcional e para hemoglobina de um indivíduo com 50% das subunidades ocupadas com CO. Os valores de pO_2 nos pulmões e nos tecidos humanos estão indicados. [Fonte: dados de F. J. W. Roughton e R. C. Darling, *Am. J. Physiol.* 141:17, 1944.]

Na suspeita de envenenamento por CO, é essencial que a pessoa seja levada para longe da fonte do gás, porém isso nem sempre leva a uma recuperação rápida. Quando um indivíduo é removido de um local poluído com CO para uma atmosfera normal, o O_2 começa a substituir o CO na hemoglobina, mas os níveis de COHb diminuem muito lentamente, pois a meia-vida é de 2 a 6,5 horas, dependendo dos fatores ambientais. Todavia, se forem administrados, por meio de uma máscara, 100% de oxigênio a uma pressão de 3 atm (303 kPa), a velocidade de troca pode ser aumentada em quatro vezes, e a meia-vida para a troca de CO por O_2 pode ser reduzida para algumas dezenas de minutos. Assim, o tratamento rápido por uma equipe médica adequadamente equipada é fundamental.

É altamente recomendado instalar detectores de monóxido de carbono em todas as casas, pois essa é uma medida simples e barata para evitar possíveis tragédias. Após completarem a pesquisa sobre este quadro, os autores imediatamente providenciaram a instalação de novos detectores de CO em suas próprias casas.

de conformação em uma subunidade individual. Essa mudança provoca uma alteração similar em uma subunidade adjacente, sendo mais provável a ligação de uma segunda molécula do ligante. Existem mais estados intermediários possíveis nesse modelo do que no modelo combinado. Os dois modelos não são mutuamente exclusivos; o modelo combinado pode ser visto como o caso restritivo “tudo ou nada” do modelo sequencial. No Capítulo 6, esses modelos serão utilizados para investigar as enzimas alostéricas.

A hemoglobina também transporta H^+ e CO_2

Além de carregar praticamente todo o oxigênio de que as células necessitam dos pulmões para os tecidos, a hemoglobina transporta dois produtos finais da respiração celular – H^+ e CO_2 – dos tecidos para os pulmões e para os rins, onde são excretados. O CO_2 , produzido pela oxidação dos combustíveis orgânicos na mitocôndria, é hidratado e forma bicarbonato:



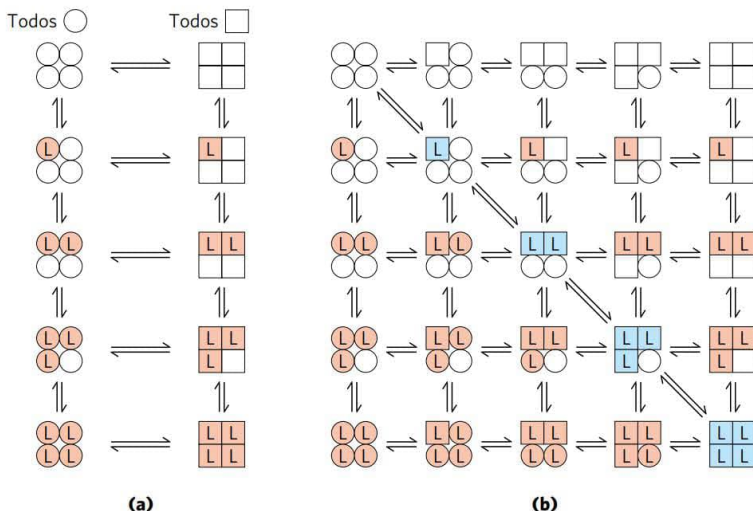


FIGURA 5-15 Dois modelos gerais para a interconversão de formas inativas e ativas de uma proteína durante a interação cooperativa com o ligante.

Embora os modelos possam ser aplicados para qualquer proteína – inclusive qualquer enzima (Capítulo 6) – que exiba ligação cooperativa, aqui estão mostradas quatro subunidades porque o modelo foi originalmente proposto para a hemoglobina. (a) No modelo combinado ou “tudo ou nada” (modelo MWC), postula-se que todas as subunidades estão na mesma conformação, todas na forma ○ (baixa afinidade ou inativa) ou na forma □ (alta afinidade ou ativa). Dependendo do equilíbrio, K_{eq} , entre as formas ○ e □, a ligação de uma ou mais moléculas do ligante (L) desloca o equilíbrio na direção da forma ○. As subunidades que ligam L estão sombreadas. (b) Nesse modelo sequencial, cada subunidade pode individualmente estar tanto na forma ○ quanto na forma □. Assim, é possível um grande número de conformações. A maioria das subunidades fica a maior parte do tempo nos estados sombreados em azul.

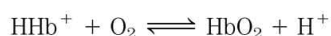
Essa reação é catalisada pela **anidrase carbônica**, uma enzima particularmente abundante nos eritrócitos. O CO_2 não é muito solúvel em solução aquosa; é possível que se formem bolhas de CO_2 nos tecidos e no sangue se ele não for convertido em bicarbonato. Como se pode observar pela reação catalisada pela anidrase carbônica, a hidratação do CO_2 resulta em aumento na concentração de H^+ (uma redução no pH) nos tecidos. A ligação do O_2 pela hemoglobina é profundamente influenciada pelo pH e pela concentração de CO_2 , de forma que a conversão desse gás em bicarbonato é fundamental na regulação da ligação do oxigênio e sua liberação no sangue.

A hemoglobina transporta para os pulmões e para os rins cerca de 40% do total de H^+ e de 15 a 20% do CO_2 formado nos tecidos. (O restante do H^+ é absorvido pelo tampão bicarbonato do plasma e o restante do CO_2 é transportado como HCO_3^- e CO_2 dissolvidos.) A ligação do H^+ e do CO_2 tem uma relação inversa com a ligação do oxigênio. No pH relativamente baixo e na alta concentração de CO_2 dos tecidos periféricos, a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio diminui quando o H^+ e o CO_2 se ligam e o O_2 é liberado para os tecidos. Nos capilares do pulmão, ao contrário, quando o CO_2 é excretado e o pH do sangue consequentemente aumenta, a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio aumenta, e a proteína liga mais O_2 para transportar para os tecidos periféricos. Esse efeito do pH e da concentração de CO_2 sobre a ligação e a liberação do oxigênio pela hemoglobina é chamado de **efeito Bohr**, referência ao fisiologista dinamarquês que o descobriu em 1904, Christian Bohr, pai de Niels Bohr.

O equilíbrio da ligação da hemoglobina a uma molécula de oxigênio pode ser expresso pela reação



mas essa não é a história completa. Para considerar o efeito da concentração de H^+ neste equilíbrio de ligação, a reação é reescrita como



em que HHb^+ é a forma protonada da hemoglobina. Essa equação nos diz que a curva de saturação da hemoglo-

bina pelo O_2 é influenciada pela concentração de H^+ (Figura 5-16). A hemoglobina se liga tanto ao O_2 quanto ao H^+ , mas com afinidade inversa. Quando a concentração do oxigênio é alta, como nos pulmões, a hemoglobina se liga ao O_2 e libera prótons. Quando a concentração é baixa, como nos tecidos periféricos, ela se liga ao H^+ e o O_2 é liberado.

O O_2 e o H^+ não se ligam ao mesmo sítio na hemoglobina. O O_2 se liga ao átomo de ferro do heme, enquanto o H^+ se liga a algum entre vários dos resíduos de aminoácidos na proteína. A principal contribuição para o efeito Bohr é dada pela His¹⁴⁶ (His HC3) das subunidades β . Esse resíduo, quando protonado, forma um dos pares iônicos – com o Asp⁹⁴ (Asp FG1) – que auxilia na estabilização da desoxi-hemoglobina no estado T (Figura 5-9). O par iônico estabiliza a forma protonada da His HC3, dando a esse resíduo um pK_a anormalmente alta no estado T. O pK_a diminui para seu valor normal de 6,0 no estado R porque o par iônico não pode se formar e esse resíduo não está protonado na oxi-hemoglobina a pH 7,6, o pH do sangue nos pulmões.

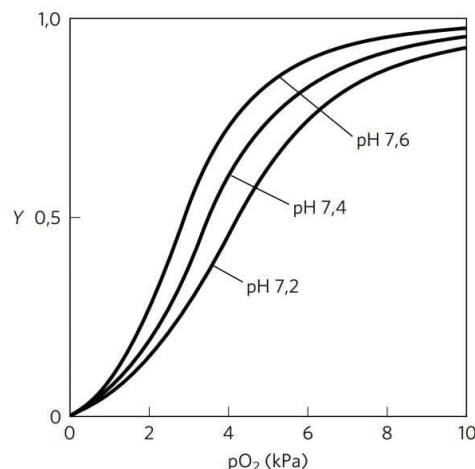
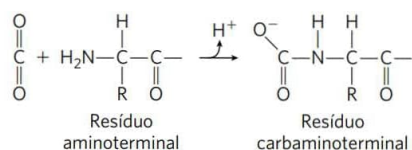


FIGURA 5-16 Efeito do pH sobre a ligação do oxigênio à hemoglobina. O pH do sangue é 7,6 nos pulmões e 7,2 nos tecidos. As medidas experimentais das ligações à hemoglobina frequentemente são realizadas a pH 7,4.

À medida que a concentração de H^+ aumenta, a protonação da His HC3 promove a liberação do oxigênio por favorecer a transição para o estado T. A protonação dos resíduos aminoterminais das subunidades α , de determinados resíduos de His e talvez de outros grupos tem efeito semelhante.

Foi visto que as quatro cadeias polipeptídicas da hemoglobina se comunicam entre si, não somente com relação à ligação do O_2 aos seus grupos heme, mas também com relação à ligação de H^+ a resíduos específicos. E essa história ainda tem mais coisas. A hemoglobina liga CO_2 , novamente de maneira irreversível se comparado à ligação com o oxigênio. O dióxido de carbono liga-se como grupo carbamato ao grupo α -amino da extremidade aminoterminal de cada cadeia de globina, formando carbamino-hemoglobina:

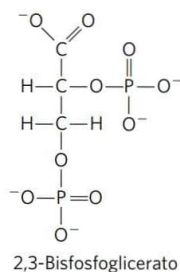


Essa reação produz H^+ , contribuindo para o efeito Bohr. Os carbamatos ligados formam também pontes salinas adicionais (não mostradas na Figura 5-9) que auxiliam na estabilização do estado T e promovem a liberação do oxigênio.

Quando a concentração do dióxido de carbono é alta, como nos tecidos periféricos, algum CO_2 se liga à hemoglobina e reduz a afinidade da hemoglobina pelo O_2 , provocando a liberação do O_2 . Quando a hemoglobina chega aos pulmões, ocorre o contrário, a alta concentração de oxigênio promove a ligação do O_2 e a liberação do CO_2 . A capacidade de transmitir a informação da interação com o ligante de uma subunidade polipeptídica para as outras faz a molécula de hemoglobina ser tão maravilhosamente adaptada na integração do transporte de O_2 , CO_2 e H^+ pelos eritrócitos.

A ligação do oxigênio com a hemoglobina é regulada por 2,3-bisfosfoglicerato

A interação do **2,3-bisfosfoglicerato (BPG)** com as moléculas de hemoglobina aprimora a função desta e serve de exemplo de modulação alostérica heterotípica.



O BPG está presente em concentração relativamente alta nos eritrócitos. Quando a hemoglobina é isolada, observa-se que ela contém grande quantidade de BPG, a qual é difícil de ser removida por completo. Na verdade, as curvas de ligação entre hemoglobina e O_2 examinadas até agora foram obtidas na presença de BPG. Sabe-se que o BPG reduz muito a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio – exis-

te uma relação inversa entre a ligação do O_2 e do BPG. Por isso, é possível descrever outro processo de ligação para a hemoglobina:



O BPG liga-se a um sítio distante do sítio de ligação do oxigênio e regula a afinidade do O_2 pela hemoglobina em relação à pO_2 nos pulmões. O BPG é importante na adaptação fisiológica à pO_2 mais baixa nas grandes altitudes. Em um ser humano saudável no nível do mar, a ligação do O_2 à hemoglobina é regulada de modo que a quantidade de O_2 liberada nos tecidos se aproxime de 40% da quantidade máxima que o sangue é capaz de transportar (**Figura 5-17**). Imagine que essa pessoa seja levada rapidamente do nível do mar para uma altitude de 4.500 metros, onde a pO_2 é muito mais baixa. A liberação de O_2 para os tecidos é reduzida. No entanto, após poucas horas em alta altitude, a concentração de BPG no sangue começa a aumentar, levando a uma redução na afinidade da hemoglobina pelo O_2 . Esse ajuste no nível circulante de BPG tem somente um pequeno efeito na ligação do O_2 nos pulmões, mas o efeito é considerável na liberação do O_2 nos tecidos. Como resultado, a liberação do

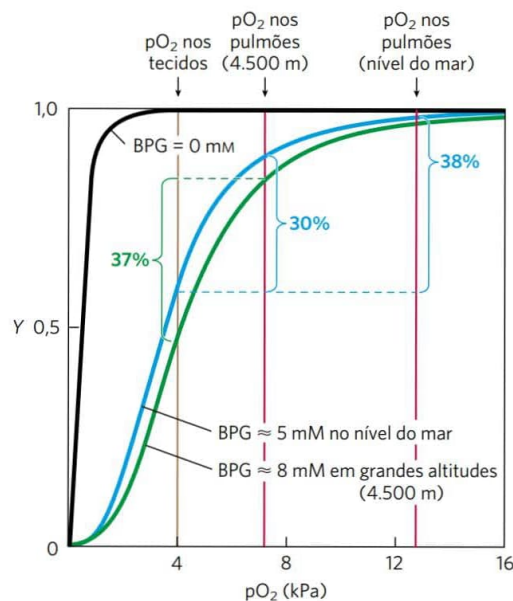


FIGURA 5-17 Efeito do 2,3-bisfosfoglicerato na ligação do oxigênio à hemoglobina. A concentração normal de BPG no sangue humano é de 5 mM no nível do mar e 8 mM a altas altitudes. Observe que a hemoglobina se liga muito fortemente ao oxigênio na ausência de BPG, e a curva de ligação parece hiperbólica. Na verdade, o coeficiente de Hill medido para a cooperatividade da ligação do O_2 se reduz muito pouco (de 3 para cerca de 2,5) quando o BPG é removido da hemoglobina, mas a parte ascendente da curva sigmoide está confinada a uma região muito pequena próxima à origem. No nível do mar, a hemoglobina presente nos pulmões está quase totalmente saturada com O_2 , mas somente um pouco acima de 60% nos tecidos, de forma que a quantidade de O_2 liberada nos tecidos alcança cerca de 38% do máximo que pode ser transportado no sangue. Em altitudes elevadas, a liberação de O_2 diminui para 30% do máximo. Um aumento na concentração de BPG, contudo, reduz a afinidade da hemoglobina por O_2 , de forma que aproximadamente 37% do que pode ser transportado é liberado novamente para os tecidos.

oxigênio para os tecidos é restaurada para cerca de 40% do O_2 que pode ser transportado pelo sangue. Essa situação é revertida quando a pessoa retorna ao nível do mar. A concentração de BPG nos eritrócitos aumenta também em pessoas que sofrem de hipoxia, ou seja, redução da oxigenação dos tecidos periféricos devido ao funcionamento inadequado dos pulmões ou do sistema circulatório.

O sítio de ligação do BPG na hemoglobina é a cavidade entre as subunidades β no estado T (**Figura 5-18**). Essa cavidade é revestida por resíduos de aminoácidos com cargas positivas que interagem com os grupos do BPG carregados negativamente. Ao contrário do O_2 , somente uma molécula de BPG se liga a cada tetrâmero da hemoglobina. O BPG reduz a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio porque estabiliza o estado T. A transição ao estado R faz o bolsão de ligação para o BPG ficar mais estreito, o que impede que o BPG se ligue. Na ausência do BPG, a hemoglobina é convertida mais facilmente ao estado R.

A regulação da ligação do oxigênio à hemoglobina pelo BPG desempenha uma função importante no desenvolvimento fetal. Como o feto precisa captar oxigênio do sangue da mãe, a hemoglobina fetal precisa ter maior afinidade pelo O_2 do que a hemoglobina materna. O feto sintetiza subunidades γ no lugar de subunidades β , formando uma hemoglo-

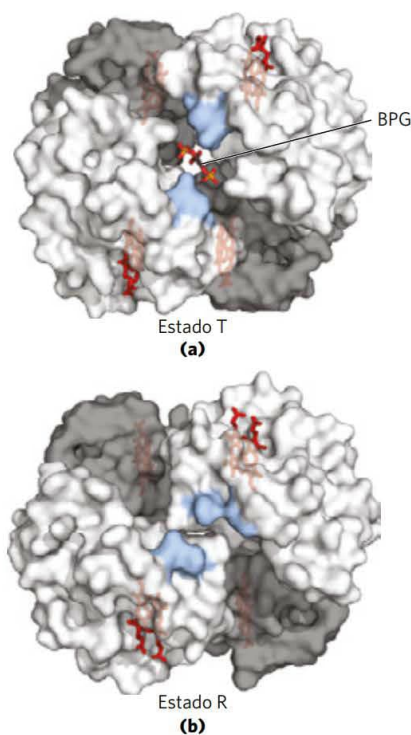


FIGURA 5-18 Ligação de 2,3-bisfosfoglicerato à hemoglobina. (a) A ligação com BPG estabiliza o estado T da desoxi-hemoglobina. As cargas negativas do BPG interagem com vários grupos positivamente carregados (mostrados em azul nesta imagem de contorno de superfície) que circundam o bolsão entre as subunidades β no estado T. (b) O bolsão de ligação com BPG desaparece com a oxigenação, acompanhando a transição para o estado R. (Comparar com a Figura 5-10.) [Fontes: (a) PDB ID 1B86, V. Richard et al., *J. Mol. Biol.* 233:270, 1993. (b) PDB ID 1BBB, M. M. Silva et al., *J. Biol. Chem.* 267:17.248, 1992.]

bina $\alpha_2\gamma_2$. Esse tetrâmero tem uma afinidade muito mais baixa pelo BPG do que a hemoglobina normal do adulto, tendo uma afinidade mais alta por O_2 .

Anemia falciforme é uma doença molecular da hemoglobina



A anemia falciforme, doença humana hereditária, demonstra de forma impressionante a importância da sequência de aminoácidos na determinação das estruturas secundária, terciária e quaternária das proteínas globulares e, portanto, suas funções biológicas. Sabe-se que existem quase 500 variantes genéticas da hemoglobina na população humana, sendo que a grande maioria é muito rara. A maior parte das variações consiste em diferenças em um único resíduo de aminoácido. Os efeitos sobre a estrutura e a função da hemoglobina geralmente são pequenos, mas às vezes podem ser extraordinários. Cada variação é produto de uma alteração diferente no gene. As variantes de um gene são denominadas alelos. Como os seres humanos geralmente têm duas cópias de cada gene, um indivíduo pode ter duas cópias de um alelo (sendo, portanto, homozigoto para esse gene) ou uma cópia de cada um de dois alelos diferentes (portanto, heterozigoto).

A anemia falciforme ocorre em indivíduos que herdaram o alelo para a hemoglobina falciforme de ambos os pais. Os eritrócitos desses indivíduos são anormais e em menor número. O sangue contém muitos eritrócitos longos e finos em forma de foice, além de muitas células imaturas (**Figura 5-19**). Quando a hemoglobina das células falciformes (chamada de hemoglobina S) é desoxigenada, ela torna-se insolúvel e forma polímeros que se agregam em fibras tubulares (**Figura 5-20**). A hemoglobina normal (hemoglobina A, ou HbA) permanece solúvel quando desoxigenada. As fibras insolúveis provocam deformação dos eritrócitos, e a proporção das células falciformes aumenta muito à medida que o sangue é desoxigenado.

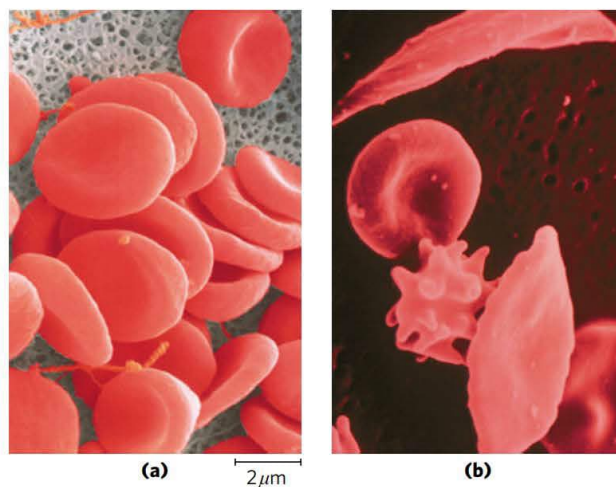


FIGURA 5-19 Comparação entre (a) eritrócitos normais, uniformes e em forma de taça e (b) eritrócitos com formas variadas vistos na anemia falciforme, que variam desde os normais até os pontudos ou em forma de foice. [Fontes: (a) A. Syred/Science Source. (b) Jackie Lewin, Royal Free Hospital/Science Source.]

As propriedades alteradas da HbS são o resultado da substituição de um único aminoácido, um resíduo de Val no lugar de um resíduo de Glu nas cadeias β . O grupo R da valina não tem carga, ao passo que o glutamato tem carga negativa em pH 7,4. Portanto, a hemoglobina S tem duas cargas negativas a menos do que a HbA (uma em cada cadeia β). A substituição do resíduo Glu pelo Val cria um ponto de contato hidrofóbico “adesivo” na posição 6 da cadeia β , que está na superfície externa da molécula. Esses pontos adesivos fazem as moléculas de HbS se associarem anormalmente entre si, formando um longo agregado fibroso que é característico da doença.

A anemia falciforme é dolorosa e fatal. As pessoas com essa doença sofrem crises repetidas provocadas por esforço físico. Elas tornam-se fracas, com vertigens e ofegantes, apresentam sopros cardíacos e aumento na pulsação. O conteúdo de hemoglobina do sangue dessas pessoas é somente a metade do valor normal de 15 a 16 g/100 mL, uma vez que as células falciformes são muito frágeis e se rompem com facilidade; isso resulta em anemia (“falta de sangue”). Uma

consequência ainda mais grave é que os capilares ficam bloqueados pelas células longas e com morfologia anormal, causando muita dor e interferindo com a função normal dos capilares. Esse é o principal fator que leva à morte prematura de muitos pacientes.

Sem tratamento médico, as pessoas com anemia falciforme geralmente morrem na infância. De modo curioso, a frequência do alelo falciforme na população é muito alta em determinadas partes da África. A investigação desse assunto levou à constatação de que, nos indivíduos heterozigotos, o alelo confere resistência pequena, mas significativa, a formas letais da malária. Os indivíduos heterozigotos sofrem de uma condição mais leve, denominada traço falciforme; apenas 1% dos eritrócitos apresentam desoxigenação. Esses indivíduos podem ter vida totalmente normal se evitarem exercícios vigorosos ou outros estresses do sistema circulatório. Como resultado da seleção natural, atualmente há uma população de alelos que equilibra os efeitos deletérios da condição homozigota com a resistência à malária propiciada pela condição heterozigota. ■

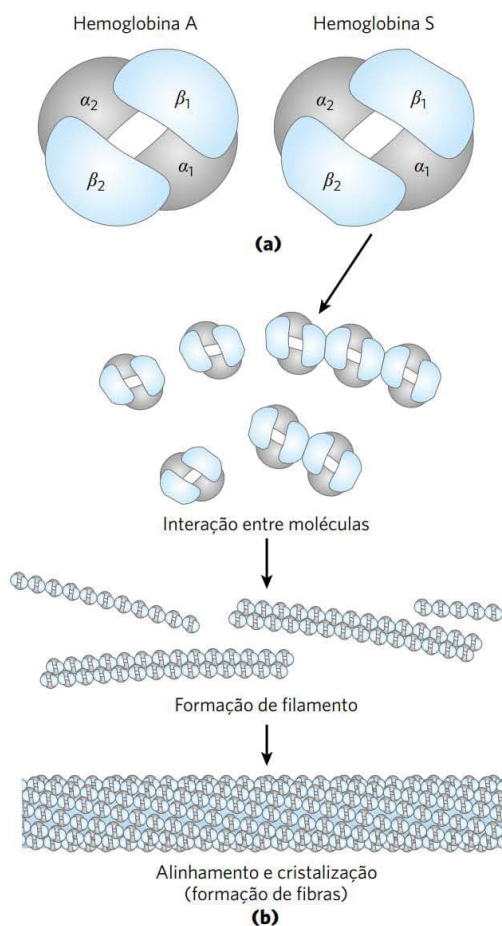


FIGURA 5-20 Hemoglobina normal e falciforme. (a) Diferenças sutis entre as conformações da HbA e da HbS resultantes da mudança de apenas um aminoácido nas cadeias β . (b) Como resultado desta mudança, a desoxi-hemoglobina S tem uma porção hidrofóbica na sua superfície, o que causa a agregação das moléculas em filamentos que se associam em fibras insolúveis.

RESUMO 5.1 Interação reversível de uma proteína com um ligante: proteínas de ligação ao oxigênio

- As funções das proteínas geralmente dependem de interação com outras moléculas. Uma proteína interage com uma molécula, conhecida como ligante, no seu sítio de ligação. As proteínas sofrem alterações conformacionais quando interagem com o ligante, processo chamado de encaixe induzido. Nas proteínas multiméricas, a interação do ligante com uma subunidade pode afetar a interação com as outras subunidades. A interação com o ligante pode ser regulada.
- A mioglobina contém um grupo prostético heme, que se liga ao oxigênio. O heme é formado por um único átomo de Fe^{2+} coordenado no interior de uma porfirina. O oxigênio liga-se reversivelmente à mioglobina; essa ligação reversível simples pode ser descrita por uma constante de associação K_a ou uma constante de dissociação K_d . Em uma proteína monomérica como a mioglobina, a fração dos sítios de ligação ocupados pelo ligante é uma função hiperbólica da concentração do ligante.
- A hemoglobina adulta normal possui quatro subunidades que contêm heme, duas subunidades α e duas subunidades β , sendo que essas estruturas são semelhantes entre si e com a mioglobina. A hemoglobina existe em dois estados estruturais alternados, T e R. O estado T é mais estável quando o oxigênio não está ligado. A ligação do oxigênio induz a transição para o estado R.
- A ligação do oxigênio à hemoglobina é alostérica e cooperativa. Quando o O_2 ocupa um sítio de ligação, a hemoglobina sofre mudanças conformacionais que afetam os outros sítios de ligação – exemplo de comportamento alostérico. As mudanças de conformação entre os estados T e R, mediadas pelas interações subunidade-subunidade, resultam em ligação cooperativa; isso é representado por uma curva de ligação sigmoide que pode ser analisada por uma curva de Hill.

- Dois modelos mais prováveis foram propostos para explicar a interação cooperativa de ligantes com proteínas multiméricas: o modelo combinado e o modelo sequencial.
- A hemoglobina também se liga ao H^+ e ao CO_2 , resultando na formação de pares iônicos que estabilizam o estado T e reduzem a afinidade da proteína pelo O_2 (o efeito Bohr). A ligação do O_2 à hemoglobina é modulada também por 2,3-bisfosfoglicerato, que se liga ao estado T e o estabiliza.
- A anemia falciforme é uma doença genética causada pela substituição de um único aminoácido (Glu⁶ por Val⁶) nas cadeias β da hemoglobina. A mudança gera uma região hidrofóbica na superfície da hemoglobina que causa a agregação das moléculas em feixes de fibras. Essa condição homozigota resulta em graves complicações de saúde.

5.2 Interações complementares entre proteínas e ligantes: o sistema imune e as imunoglobulinas

Foi visto como as conformações das proteínas de ligação ao oxigênio afetam e são afetadas pela interação de ligantes pequenos (O_2 ou CO) com o grupo heme. No entanto, a maioria das interações proteína-ligante não envolve um grupo prostético. Em vez disso, o sítio de ligação com o ligante mais comumente se parece com o sítio de ligação da hemoglobina com o BPG, uma fenda na proteína revestida por resíduos de aminoácidos, organizados de forma que tornam a interação altamente específica. A diferenciação eficaz entre os ligantes é a norma nos sítios de ligação, mesmo quando os ligantes apresentam apenas pequenas diferenças estruturais.

Todos os vertebrados têm um sistema imune capaz de fazer a distinção molecular entre “próprio” e “não próprio” e destruir o que for identificado como não próprio. Dessa forma, o sistema imune elimina vírus, bactérias e outros patógenos e moléculas que possam representar ameaça ao organismo. Em nível fisiológico, a **resposta imune** é formada por um conjunto intrincado e coordenado de interações entre muitas classes de proteínas, moléculas e tipos celulares. Considerando-se as proteínas individualmente, a resposta imune demonstra como um sistema bioquímico altamente sensível pode ser desenvolvido a partir de interações reversíveis entre ligantes e proteínas.

A resposta imune inclui um conjunto de células e proteínas especializadas

A imunidade é realizada por meio de uma grande variedade de **leucócitos** (células brancas do sangue), incluindo os **macrófagos** e os **linfócitos**, todos desenvolvidos na medula óssea a partir de células-tronco não diferenciadas. Os linfócitos deixam a corrente sanguínea e patrulham os tecidos, cada célula produzindo uma ou mais proteínas capazes de reconhecer e de se ligar a moléculas que poderiam sinalizar uma infecção.

A resposta imune consiste em dois sistemas complementares, os sistemas imunes humoral e celular. O **sistema**

imune humoral (do latim, *humor*; “fluido”) tem como alvo infecções bacterianas e vírus extracelulares (encontrados nos fluidos do corpo), mas também pode responder a proteínas estranhas. O **sistema imune celular** destrói células hospedeiras infectadas por vírus, além de destruir alguns parasitas e tecidos estranhos.

No centro da resposta imune humoral estão proteínas solúveis, chamadas de **anticorpos** ou **imunoglobulinas**, abreviadas como **Ig**. As imunoglobulinas ligam-se a bactérias, vírus ou moléculas grandes identificados como estranhos e os levam para a destruição. Constituinte 20% do total das proteínas sanguíneas, as imunoglobulinas são produzidas pelos **linfócitos B**, ou **células B**, que completam seu desenvolvimento na medula óssea.

Os efetores no centro da resposta imune celular são uma classe de **linfócitos T**, ou **células T** (assim chamadas porque os últimos estágios de desenvolvimento ocorrem no timo), conhecidas como **células T citotóxicas** (**células T_C**). O reconhecimento de células infectadas ou de parasitas envolve proteínas, chamadas de **receptores de células T**, na superfície das células T citotóxicas. Os receptores são proteínas normalmente encontradas na superfície externa das células e que se estendem através da membrana plasmática. Esses receptores reconhecem e interagem com ligantes extracelulares, desencadeando mudanças no interior da célula.

Além das células T citotóxicas, existem as **células T auxiliares** (**células T_H**, do inglês, *helper T cells*), cuja função é produzir proteínas sinalizadoras solúveis, chamadas de citocinas, entre as quais se incluem as interleucinas. As células T_H interagem com macrófagos e participam indiretamente na destruição de células infectadas e de patógenos ao estimularem a proliferação seletiva das células T_C das células B que podem se ligar a antígenos específicos. Esse processo, chamado de **seleção clonal**, aumenta o número de células do sistema imune que podem responder a um patógeno específico. A importância das células T_H é ilustrada pela epidemia produzida pelo HIV (vírus da imunodeficiência humana), o vírus que causa a Aids (síndrome da imunodeficiência adquirida). As células T_H são o alvo primário da infecção por HIV, e a eliminação dessas células incapacita de maneira progressiva o sistema imune. A Tabela 5-2 resume as funções de alguns leucócitos do sistema imune.

Cada proteína de reconhecimento do sistema imune, seja um receptor de célula T ou um anticorpo produzido pelas células B, liga-se especificamente a uma determinada estrutura química, distinguindo-a de todas as outras. Os seres humanos têm a capacidade de produzir mais de 10^8 anticorpos diferentes com diferentes especificidades de ligação. Em decorrência dessa extraordinária diversidade, qualquer estrutura química na superfície de um vírus ou de uma célula invasora tem probabilidade de ser reconhecida por um ou mais anticorpos e interagir com eles. A diversidade de anticorpos decorre do rearranjo aleatório de um conjunto de segmentos de genes de imunoglobulina por meio dos mecanismos de recombinação gênica apresentados no Capítulo 25 (ver Figura 25-43).

Usa-se um vocabulário especializado para descrever as interações exclusivas entre os anticorpos ou receptores de células T e as moléculas com as quais se ligam. Qualquer molécula ou patógeno capaz de induzir resposta imune é

TABELA 5-2 Alguns tipos de leucócitos associados com o sistema imune

Tipo celular	Função
Macrófagos	Ingerem, por fagocitose, células e partículas grandes
Linfócitos B (células B)	Produzem e secretam anticorpos
Linfócitos T (células T)	
Células T citotóxicas (T_C , <i>Killer</i>)	Interagem com células hospedeiras infectadas por meio de receptores na superfície das células T
Célula T auxiliar (T_H)	Interagem com macrófagos e secretam citocinas (interleucinas) que estimulam a proliferação das células T_C , T_H e B.

denominado **antígeno**. Um antígeno pode ser um vírus, uma parede bacteriana, uma proteína isolada ou outra macromolécula. Um antígeno complexo pode interagir com vários anticorpos diferentes. Um determinado anticorpo ou um receptor de célula T se liga somente a uma estrutura molecular específica dentro do antígeno, chamada de **determinante antigênico** ou **epítipo**.

Seria improdutivo para o sistema imune responder a pequenas moléculas, intermediários comuns e produtos

do metabolismo celular. Moléculas com massa molecular menor que 5.000 em geral não são reconhecidas como antígeno. No entanto, quando as moléculas pequenas são unidas covalentemente a uma proteína grande no laboratório, elas podem ser usadas para induzir uma resposta imune. Essas moléculas pequenas são chamadas de **haptenos**. Os anticorpos produzidos em resposta aos haptenos ligados a proteínas se ligam a essas mesmas moléculas pequenas quando elas estão livres. Esses anticorpos são utilizados para desenvolver testes analíticos, descritos adiante neste capítulo, ou também como ligante específico em cromatografia de afinidade (ver Figura 3-17c). A seguir, será feita uma descrição mais detalhada dos anticorpos e das suas propriedades de ligação.

Os anticorpos têm dois sítios idênticos de ligação ao antígeno

A **imunoglobulina G (IgG)** é a principal classe de molécula de anticorpo e é uma das proteínas mais abundantes no soro sanguíneo. As IgG são formadas por quatro cadeias polipeptídicas: duas cadeias pesadas (grandes) e duas cadeias leves, unidas por ligações não covalentes e ligações dissulfeto, formando um complexo com massa molecular de 150.000. As cadeias pesadas interagem em uma das extremidades e se ramificam para interagir separadamente com as cadeias leves, formando uma molécula com a forma de Y (**Figura 5-21**). As imunoglobulinas podem ser hidrolisadas por proteases nas “dobradiças” que separam

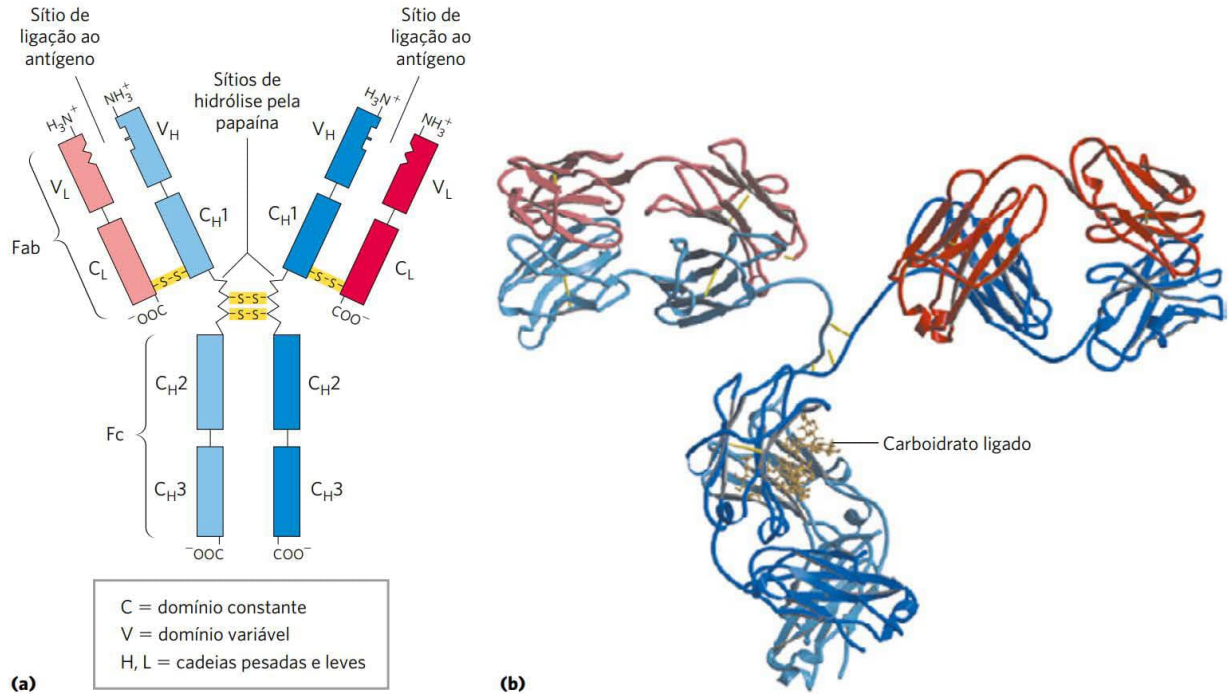


FIGURA 5-21 Imunoglobulina G. (a) Pares de cadeias leves e pesadas combinam-se para formar uma molécula com formato de Y. Dois sítios de ligação ao antígeno formam-se pela combinação dos domínios variáveis de uma cadeia leve (V_L) e de uma cadeia pesada (V_H). Hidrólise com papaína separa as porções Fab e Fc da proteína na região da dobradiça. A porção Fc também possui carboidratos ligados (mostrado em b). (b) Modelo de fita da primeira molécula de IgG cristalizada e que teve sua estrutura determinada. Embora a molécula tenha duas cadeias pesadas idênticas (dois tons de azul) e duas cadeias leves idênticas (dois tons de vermelho), ela cristaliza na conformação assimétrica mostrada aqui. É possível que a flexibilidade conformacional seja importante para a função das imunoglobulinas. [Fonte: (b) PDB ID 1IGT, L. J. Harris et al., *Biochemistry* 36:1581, 1997.]

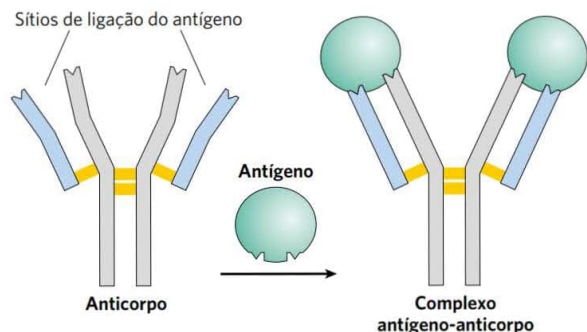


FIGURA 5-22 Ligação de IgG a um antígeno. Os sítios de ligação na IgG frequentemente sofrem pequenas mudanças conformacionais para gerar um encaixe ótimo para o antígeno. Esse encaixe induzido é comum em muitas interações de proteínas com ligantes.

a base da molécula de seus braços. Hidrólise por papaína libera o fragmento basal, chamado de **Fc** porque geralmente *c* cristaliza com facilidade, e os dois ramos, chamados de **Fab** (do inglês, *antigen-binding*), ou seja, os fragmentos de ligação ao antígeno. Cada ramo tem um único sítio de ligação ao antígeno.

A estrutura básica das imunoglobulinas foi estabelecida por Gerald Edelman e Rodney Porter. Cada cadeia é feita de domínios bem discerníveis. Alguns são constantes tanto na sequência como na estrutura, como ocorre entre as IgG, e outros são variáveis. Os domínios constantes têm uma estrutura característica conhecida como **padrão de enovelamento das imunoglobulinas**, motivo estrutural bem conservado em todas as proteínas da classe β (Capítulo 4). Existem três domínios constantes em cada cadeia pesada e um em cada cadeia leve. As cadeias leves e pesadas também têm, cada uma delas, um domínio variável, no qual se encontra a maior parte da variabilidade na sequência de aminoácidos. Os domínios variáveis associam-se para formar o sítio de ligação ao antígeno (Figura 5-21), permitindo a formação de um complexo antígeno-anticorpo (Figura 5-22).

Em muitos vertebrados, a IgG é uma das cinco classes de imunoglobulinas. Cada classe tem um tipo característico de cadeia pesada, denominadas α , δ , ϵ , γ e μ para IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente. Dois tipos de cadeias leves, κ e λ , ocorrem em todas as classes de imunoglobulinas. A estrutura global da IgD e da IgE é semelhante à da IgG. A IgM ocorre tanto como monômero, a forma de ligação à membrana, quanto como forma secretada que consiste em um pentâmero da sua estrutura básica (Figura 5-23). A IgA, encontrada principalmente em secreções, como saliva, lágrima e leite, pode ser monômero, dímero ou trímero. A IgM é o primeiro anticorpo sintetizado pelos linfócitos B e o principal anticorpo nos estágios iniciais de uma resposta imune primária. Algumas células B logo começam a produzir IgD (com o mesmo sítio de ligação ao antígeno que a IgM produzida pela mesma célula), mas sua função específica é menos clara.

A IgG descrita anteriormente é o principal anticorpo secundário na resposta imune que é iniciada por uma classe de células B, denominadas células B de memória. A IgG é a imunoglobulina mais abundante no sangue e faz parte da

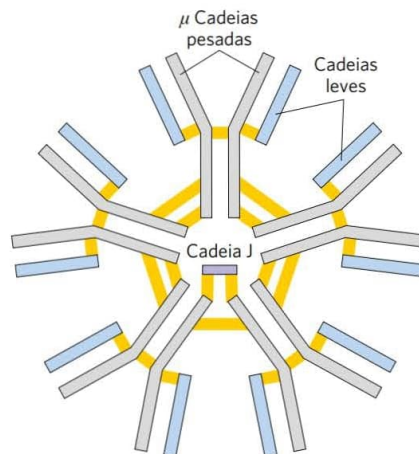


FIGURA 5-23 Pentâmero IgM em imunoglobulina de várias subunidades. O pentâmero é unido por ligações dissulfeto (em amarelo). A cadeia J é um polipeptídeo de M_r 20.000, encontrado tanto em IgA como em IgM.

imunidade continuada do organismo aos antígenos já encontrados e combatidos. Quando a IgG se liga a uma bactéria invasora ou a um vírus, ela ativa determinados leucócitos, como os macrófagos, para englobar e destruir o invasor e ativa, também, alguns outros elementos da resposta imune. Os receptores na superfície dos macrófagos reconhecem e se ligam à região Fc da IgG. Quando esses receptores se ligam a um complexo patógeno-anticorpo, o macrófago engloba, por fagocitose, o complexo (Figura 5-24).



A IgE tem um papel importante na resposta alérgica, interagindo com basófilos (leucócitos fagocíticos) no sangue e com células secretoras de histamina, chamadas de mastócitos, altamente distribuídas nos tecidos. Essa imunoglobulina se liga, por meio da região Fc, a receptores especiais nos basófilos ou nos mastócitos. Assim, a IgE serve como receptor para o antígeno. Se houver um antígeno ligado, as células são induzidas a secretar histamina e outras aminas com atividades biológicas que causam dilatação e aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos. Pensa-se que esses efeitos sobre os vasos facilitam o movimento das células e proteínas do sistema imu-

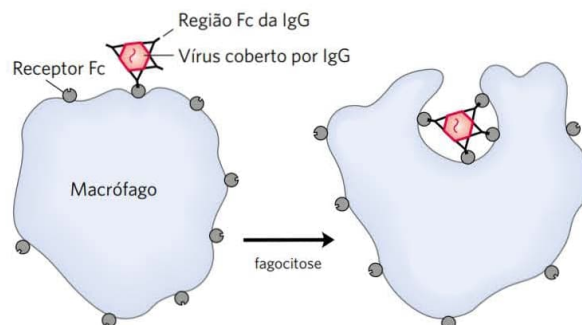


FIGURA 5-24 Fagocitose de vírus ligado a anticorpos por um macrófago. A região Fc dos anticorpos ligados ao vírus se liga aos receptores Fc na superfície de um macrófago, desencadeando o englobamento e a destruição do vírus.

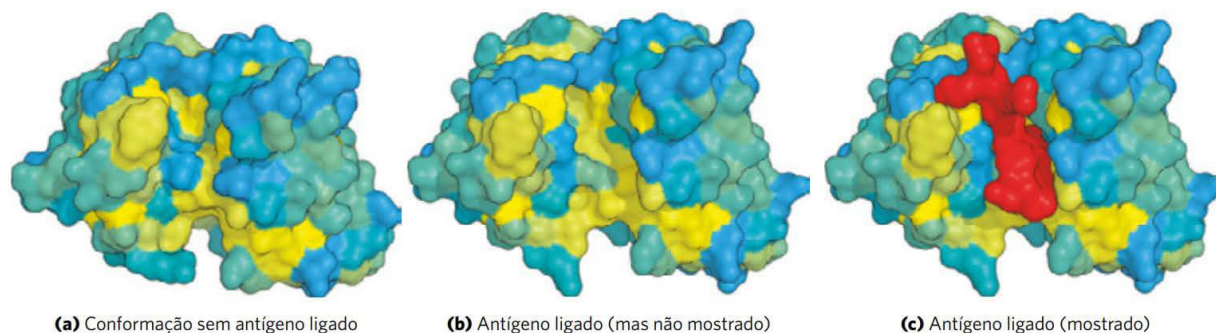


FIGURA 5-25 Encaixe induzido na ligação de um antígeno à IgG. O fragmento Fab de uma molécula de IgG está mostrado com a superfície de contorno colorida de modo a representar a hidrofobicidade. As superfícies hidrofóbicas estão em amarelo, as superfícies hidrofílicas em azul e as superfícies intermediárias estão em tons de azul, verde e amarelo. **(a)** Vista de fragmento de Fab na ausência de antígeno (um peptídeo pequeno derivado do HIV) na direção do sítio de ligação do antígeno. **(b)** A mesma visão com o fragmento de Fab na conformação “ligada” com o antígeno. O antígeno foi omitido para não obstruir a visão do sítio de ligação alterado. Observe como a cavidade de ligação se alargou e vários grupos tiveram suas posições alteradas. **(c)** A mesma vista de (b) com o antígeno (em vermelho) no sítio de ligação. [Fontes: (a) PDB ID 1GGC, R. L. Stanfield et al., *Structure* 1:83, 1993. (b, c) PDB ID 1GGI, J. M. Rini et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6325, 1993.]

ne para o local da inflamação. Esses efeitos também produzem os sintomas normalmente associados com alergias. O pólen ou outros alérgenos são reconhecidos como estranhos, desencadeando uma resposta imune normalmente reservada contra patógenos. ■

Os anticorpos ligam-se ao antígeno de modo firme e específico

A especificidade de ligação de um anticorpo é determinada pelos resíduos de aminoácidos presentes nos domínios variáveis das cadeias leves e pesadas. Muitos resíduos desses domínios são variáveis, mas não igualmente. Alguns, chamados de hipervariáveis, são bem mais suscetíveis à variação, em especial os que formam as franjas do sítio de ligação ao antígeno. A especificidade é conferida pela complementaridade química entre o antígeno e o seu sítio específico de ligação, em termos de forma e da localização dos grupos carregados, apolares e com ligações de hidrogênio. Por exemplo, um sítio de ligação com um grupo de carga negativa pode se ligar a um antígeno com carga positiva na posição complementar. Em muitos casos, a complementaridade é obtida de modo interativo, uma vez que as estruturas do antígeno e do sítio de ligação sofrem influência uma da outra à medida que se aproximam. As mudanças conformacionais no anticorpo e/ou no antígeno, então, permitem a interação completa entre os grupos complementares. Esse é um exemplo de encaixe induzido. O complexo formado por um peptídeo derivado do HIV (modelo de antígeno) e uma molécula Fab, mostrado na **Figura 5-25**, ilustra algumas dessas propriedades. As mudanças na estrutura observadas após a ligação do antígeno são particularmente notáveis neste exemplo.

Uma interação antígeno-anticorpo típica é muito forte, caracterizada por valores de K_d tão baixos quanto 10^{-10} M (lembre-se de que K_d menor corresponde a uma interação mais forte; ver Tabela 5-1). K_d reflete a energia derivada do efeito hidrofóbico, as várias ligações iônicas, ligações de hidrogênio e as interações de van der Waals que estabilizam a ligação. A energia de ligação necessária para produzir uma K_d de 10^{-10} M é de cerca de 65 kJ/mol.

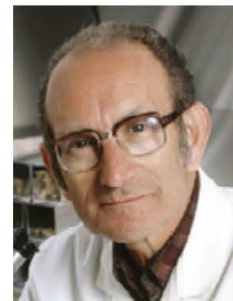
A interação antígeno-anticorpo é a base para uma grande variedade de procedimentos analíticos importantes

A extraordinária afinidade de ligação e a especificidade dos anticorpos os tornam reagentes analíticos valiosos. Dois tipos de preparação de anticorpos são utilizados: policlonal e monoclonal. Os **anticorpos policlonais** são aqueles produzidos por muitos linfócitos B diferentes em resposta a um antígeno, como uma proteína injetada em um animal. As células na população de linfócitos B produzem anticorpos que se ligam a epítopos diferentes e específicos no antígeno. Assim, as preparações policlonais contêm uma mistura de anticorpos que reconhecem diferentes partes da proteína. Os **anticorpos monoclonais**, por outro lado, são sintetizados por uma população de células B idênticas (um **clone**) em cultivo celular. Esses anticorpos são homogêneos, todos reconhecendo o mesmo epítipo. A técnica para produção de anticorpos monoclonais foi desenvolvida por Georges Köhler e Cesar Milstein.

A especificidade dos anticorpos tem utilidade prática. Um determinado anticorpo pode ser ligado covalentemente a uma resina e usado em uma coluna cromatográfica, como mostrado na Figura 3-17c. Quando uma mistura de proteínas é adicionada à coluna, o anticorpo liga-se especificamente à proteína-alvo e a retém na coluna enquanto as outras proteí-

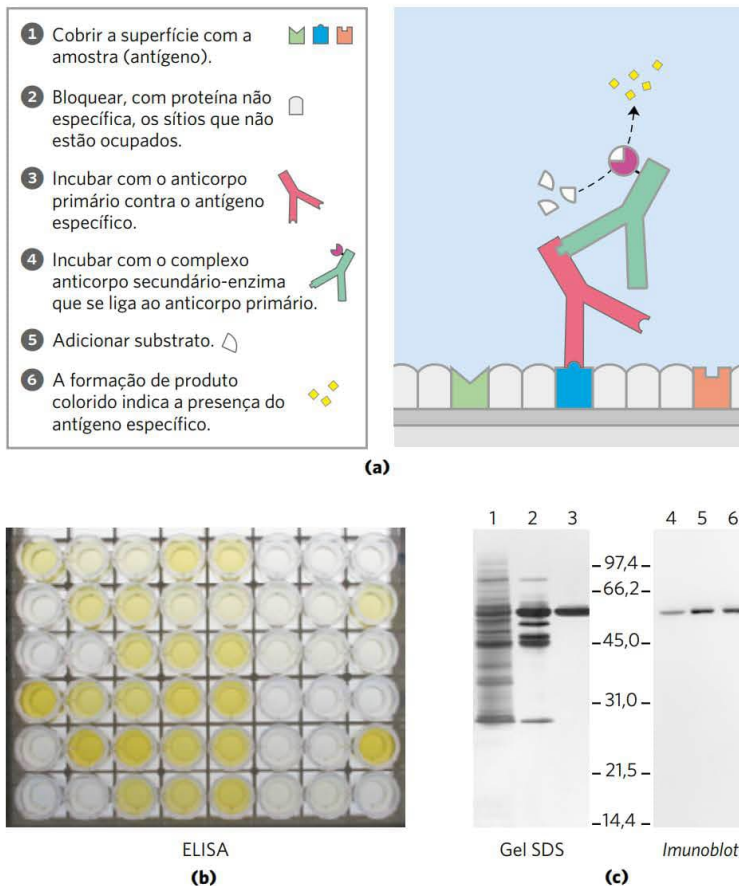


Georges Köhler, 1946-1995
[Fonte: Bettman/Corbis.]



Cesar Milstein, 1927-2002
[Fonte: Corbin O'Grady Studio/Science Source.]

FIGURA 5-26 Técnicas com anticorpo. A reação específica de um anticorpo com o antígeno correspondente é a base de várias técnicas que identificam e quantificam uma proteína específica presente em uma amostra complexa. **(a)** Representação esquemática do método geral. **(b)** Elisa para testar a presença de anticorpos anti-HSV (vírus do herpes simples) em amostras de sangue. Os poços foram recobertos com o antígeno HSV, ao qual os anticorpos contra HSV se ligam. O segundo anticorpo é uma anti-IgG humana ligada à peroxidase. Ao se completarem as etapas mostradas em (a), os poços com coloração amarelo-brilhante são os que contêm as amostras de sangue com as maiores quantidades de anticorpos anti-HSV. **(c)** Immunoblot. As canaletas 1 a 3 são de um gel de SDS. Amostras de estágios sucessivos na purificação de uma proteína-cinase foram separadas e coradas com azul de Coomassie. As canaletas 4 a 6 mostram as mesmas amostras, mas que foram transferidas eletroforéticamente para uma membrana de nitrocelulose após a separação no gel de SDS. A membrana foi então “sondada” com anticorpo contra a proteína-cinase. Os números entre o gel e o imunoblot indicam a massa molecular, M_r , em milhares. [Fontes: (b, c) State of Wisconsin Lab of Hygiene, Madison, WI.]



nas não são retidas. A proteína-alvo é então eluída da resina por uma solução salina ou algum outro agente. Essa é uma ferramenta potente na análise de proteínas.

Em outra técnica analítica versátil, um anticorpo é ligado a um marcador radioativo ou a algum outro reagente que o torna facilmente detectável. Quando o anticorpo se liga à proteína-alvo, o marcador revela a presença da proteína em uma solução ou a sua localização em um gel, ou mesmo em uma célula viva. Diversas variações desse procedimento estão ilustradas na **Figura 5-26**.

ELISA (do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*, ou ensaio de imunoadsorção ligado à enzima) pode ser usado para fazer uma triagem rápida da quantidade de um antígeno presente em uma amostra (Figura 5-26b). As proteínas da amostra são adsorvidas em uma superfície inerte, geralmente uma placa de poliestireno com 96 poços. A superfície é lavada com uma solução de alguma proteína não específica de baixo custo (em geral, caseína de leite em pó sem gordura) para impedir que as proteínas introduzidas nas etapas posteriores adsorvam nos locais onde não houve adsorção de proteínas da amostra. A superfície é, então, tratada com solução contendo o anticorpo primário, o anticorpo contra a proteína de interesse. Anticorpos não ligados são removidos por lavagem, e a superfície é tratada com uma solução contendo um anticorpo secundário – anticorpo contra o anticorpo primário – ligado a uma enzima que catalisa uma reação que forma um produto colorido. Após a remoção do anticorpo secundário não ligado, é adicionado

o substrato da enzima. A formação do produto (monitorada pela intensidade da cor) é proporcional à concentração, na amostra, da proteína de interesse.

Em um **ensaio de imunoblot**, também chamado de **Western blot** (Figura 5-26c), as proteínas separadas por eletroforese em gel são transferidas eletroforéticamente para uma membrana de nitrocelulose. A membrana é bloqueada (conforme descrito antes para o ELISA) e tratada sucessivamente com o anticorpo primário, com o anticorpo secundário ligado à enzima e com o substrato. Um precipitado colorido se forma somente na banda que contém a proteína de interesse. O imunoblot permite a detecção de um componente minoritário em uma amostra e fornece uma estimativa de sua massa molecular.

Outras facetas dos anticorpos serão abordadas em capítulos posteriores. Extremamente importantes em medicina, os anticorpos podem esclarecer muito sobre a estrutura das proteínas e a ação dos genes.

RESUMO 5.2 Interações complementares entre proteínas e ligantes: o sistema imune e as imunoglobulinas

■ A resposta imune é mediada por interações entre um grupo de leucócitos especializados e suas proteínas. Linfócitos T produzem receptores de células T. Linfócitos B produzem imunoglobulinas. Em um processo chamado de seleção clonal, as células T auxiliares induzem a proliferação ou de células B e células T citotóxicas, que

produzem imunoglobulinas, ou de receptores de células T, que interagem com um antígeno específico.

- Os seres humanos têm cinco classes de imunoglobulinas, cada uma com funções biológicas distintas. A IgG é a classe mais abundante, sendo uma proteína em formato de Y com duas cadeias pesadas e duas cadeias leves. Os domínios próximos da extremidade superior do Y são hipervariáveis no conjunto da vasta população das IgG e formam dois sítios de ligação ao antígeno.
- Determinada imunoglobulina geralmente interage com somente uma parte, chamada de epítipo, de um antígeno grande. A interação frequentemente envolve mudanças na conformação da IgG, um encaixe induzido ao antígeno.
- A especificidade requintada das imunoglobulinas é explorada em muitas técnicas, como ELISA e imunoblot.

5.3 Interações proteicas moduladas por energia química: actina, miosina e motores moleculares

Os organismos se movem. As células se movem. As organelas e as macromoléculas se movem dentro das células. A maioria desses movimentos deve-se à atividade de uma classe fascinante de motores moleculares proteicos. Supridos com energia química, geralmente derivada de ATP, grandes agregados de proteínas motoras são submetidos a mudanças conformacionais cíclicas que se acumulam em uma força unificada e direcional, a força muito pequena que separa os cromossomos em uma célula em divisão e uma força imensa que impulsiona no ar um felino selvagem de um quarto de tonelada.

As interações entre proteínas motoras, como se pode prever, deve-se à complementariedade dos arranjos iônicos, ligações de hidrogênio e grupos hidrofóbicos nos sítios de ligação da proteína. Nas proteínas motoras, entretanto, o resultado dessas interações atinge um nível excepcionalmente alto de organização espacial e temporal.

As proteínas motoras são a base da migração das organelas ao longo dos microtúbulos, os movimentos dos flagelos dos eucariotos e das bactérias, o movimento de proteínas ao longo do DNA e a contração dos músculos. As proteínas chamadas de cinesinas e dineínas movem-se ao longo dos microtúbulos, puxando organelas ou reorganizando os cromossomos durante a divisão celular. A interação da dineína com os microtúbulos realiza o movimento dos cílios e dos flagelos eucarióticos. O movimento flagelar das bactérias envolve um motor rotacional complexo na base do flagelo (ver Figura 19-41). As helicases, as polimerases e outras proteínas movem-se ao longo do DNA ao realizarem suas funções no metabolismo do ácido nucleico (Capítulo 25). A seguir, o exemplo bem-estudado das proteínas contráteis do músculo esquelético dos vertebrados será analisado como paradigma de como as proteínas transformam energia química em movimento.

A actina e a miosina são as principais proteínas do músculo

A força contrátil do músculo é gerada pela interação de duas proteínas, miosina e actina. Essas proteínas são organizadas em filamentos submetidos a interações transitórias

que deslizam uns sobre os outros para realizar a contração. Juntas, a actina e a miosina compõem mais de 80% da massa proteica do músculo.

A **miosina** (M_r 520.000) tem seis subunidades: duas cadeias pesadas (cada qual com M_r 220.000) e quatro cadeias leves (cada qual com M_r 20.000). As cadeias pesadas respondem pela maior parte da estrutura total. Em suas extremidades carboxiterminais, elas estão organizadas como α -hélices estendidas, enroladas umas ao redor das outras em uma espiral fibrosa enrolada para a esquerda, como ocorre na α -queratina (**Figura 5-27a**). Cada cadeia pesada tem, nas extremidades aminoterminais, um domínio globular grande contendo o sítio onde o ATP é hidrolisado. As cadeias leves estão associadas com o domínio globular. Quando a miosina é tratada com a protease tripsina por um período curto, a maioria das fibras é hidrolisada, dividindo a proteína em componentes, chamados de meromiosinas leve e pesada (Figura 5-27b). O domínio globular, denominado subfragmento 1 (ou S1) da miosina ou simplesmente grupo da cabeça da miosina, é liberado da miosina pesada por clivagem com papaína, liberando o subfragmento 2 (ou S2). O fragmento S1, o domínio motor que torna possível a contração muscular, pode ser cristalizado, e sua estrutura completa, conforme determinada por Ivan Rayment e Hazel Holden, está mostrada na Figura 5-27c.

Nas células musculares, as moléculas de miosina agregam-se e formam estruturas chamadas de **filamentos grossos** (**Figura 5-28a**). Essas estruturas em forma de bastão são o centro da unidade contrátil. Dentro do filamento grosso, várias centenas de moléculas de miosina estão organizadas com suas “caudas” fibrosas associadas de modo a formar uma estrutura bipolar longa. O domínio globular projeta-se de cada uma das extremidades dessa estrutura, em arranjos regulares empilhados.

A segunda proteína importante do músculo, a **actina**, é abundante em quase todas as células eucarióticas. No músculo, as moléculas da actina monomérica, chamadas de actina G (actina globular, M_r 42.000), associam-se para formar um polímero longo, chamado de actina F (actina filamentosa). O **filamento fino** consiste em actina F (Figura 5-28b) juntamente com as proteínas troponina e tropomiosina (apresentadas a seguir). A parte filamentosa dos filamentos finos é montada pela adição sucessiva de moléculas monoméricas de actina a uma das extremidades. Nesse processo, cada monômero se liga ao ATP e o hidrolisa a ADP, de forma que cada molécula de actina no filamento está complexada com ADP. A hidrólise do ATP pela actina funciona somente na montagem dos filamentos; ela não contribui de maneira direta para a energia gasta na contração muscular. Cada monômero de actina no filamento fino pode se ligar firme e especificamente a uma cabeça de miosina (Figura 5-28c).

Proteínas adicionais organizam os filamentos finos e grossos em estruturas ordenadas

O músculo esquelético consiste em feixes paralelos de **fibras musculares**, sendo cada fibra uma única célula multinucleada muito grande, com 20 a 100 μm de diâmetro, formada pela fusão de muitas células; uma única fibra geralmente tem o comprimento do músculo. Cada fibra contém cerca de 1.000 **miofibrilas**, com 2 μm de diâmetro, cada uma consistindo de um grande número de filamentos finos

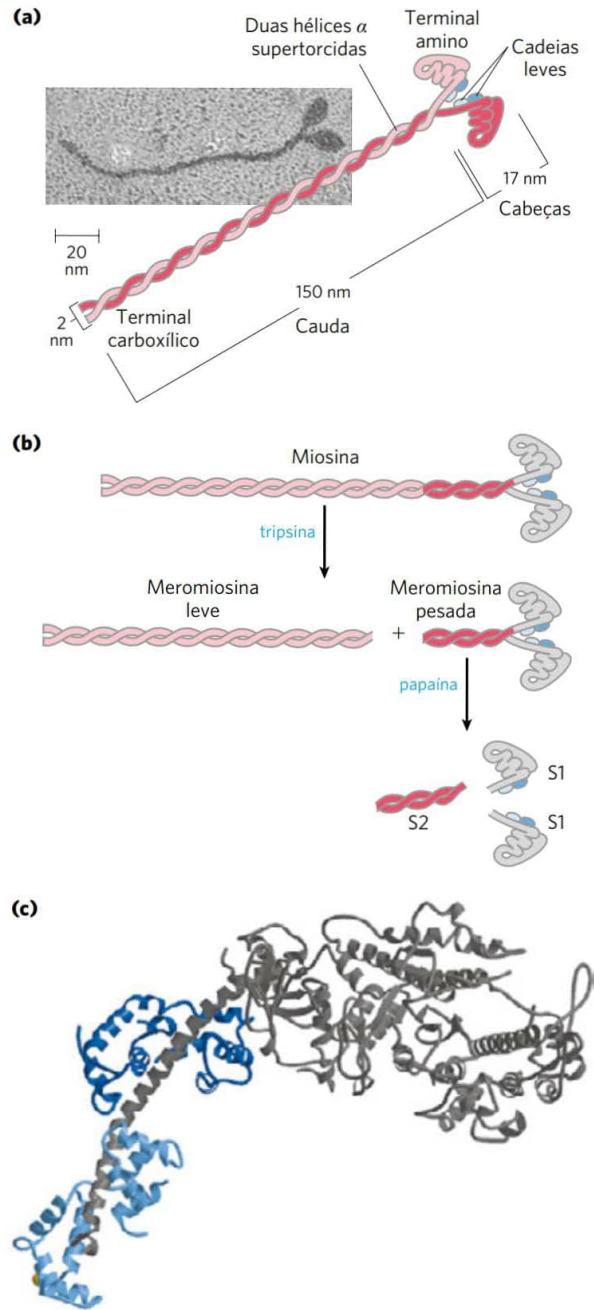


FIGURA 5-27 Miosina. (a) A miosina tem duas cadeias pesadas (em duas tonalidades de cor-de-rosa), com os terminais carboxílicos formando uma espiral enrolada estendida (cauda) e os terminais amino formando domínios globulares (cabeças). Duas cadeias leves (em azul) associam-se com cada cabeça de miosina. (b) A clivagem com tripsina e papaína separa as cabeças da miosina (fragmentos S1) das caudas (fragmentos S2). (c) Representação do fragmento S1 da miosina em forma de fita. A cadeia pesada está em cinza e as duas cadeias leves estão em duas tonalidades de azul. [Fontes: (a) Takeshi Katayama, et al. "Stimulatory effects of arachidonic acid on myosin ATPase activity and contraction of smooth muscle via myosin motor domain," *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* Vol 298, Fascículo 2, pp. H505-H514, fevereiro de 2010, Fig. 6b. (c) Cortesia de Ivan Rayment, University of Wisconsin-Madison, Enzyme Institute and Department of Biochemistry; PDB ID 2MYS, I. Rayment et al., *Science* 261:50, 1993.]

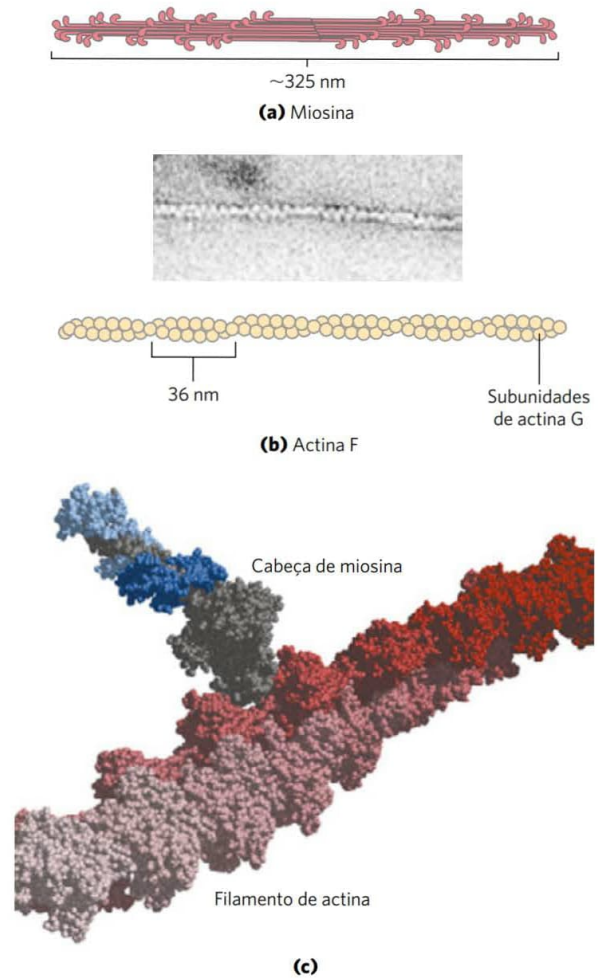


FIGURA 5-28 Os componentes principais do músculo. (a) A miosina agrega-se e forma uma estrutura bipolar chamada de filamento grosso. (b) A actina F é um conjunto filamentosos de monômeros de actina G que polimerizam dois a dois, dando o aspecto de dois filamentos enrolados um sobre o outro em uma orientação à direita. (c) Modelo de preenchimento espacial de um filamento de actina (em vermelho) com uma cabeça de miosina (em cinza e dois tons de azul) ligados a um monômero de actina do filamento. [Fontes: (b) Dr. Roger W. Craig PhD, University of Massachusetts Medical School. (c) Cortesia de Ivan Rayment, University of Wisconsin-Madison, Enzyme Institute and Department of Biochemistry; PDB ID 2MYS, I. Rayment et al., *Science* 261:50, 1993.]

e grossos regularmente organizados e complexados com outras proteínas (**Figura 5-29**). Um sistema de vesículas membranosas achatadas, chamado de **retículo sarcoplasmático**, circunda cada miofibrila. As fibras musculares, ao microscópio eletrônico, mostram regiões alternadas de alta e baixa densidade eletrônica, chamadas de **bandas A** e **bandas I** (Figura 5-29b, c). Essas bandas resultam da disposição dos filamentos grossos e finos, que estão alinhados e parcialmente sobrepostos. A banda I é a região do feixe que, em secção transversal, contém somente filamentos finos. A banda A, mais escura, estende-se pelo comprimento do filamento grosso e inclui a região de sobreposição dos filamentos grossos e finos. A banda I é dividida ao meio pela estrutura chamada de **disco Z**, perpendicular aos filamen-

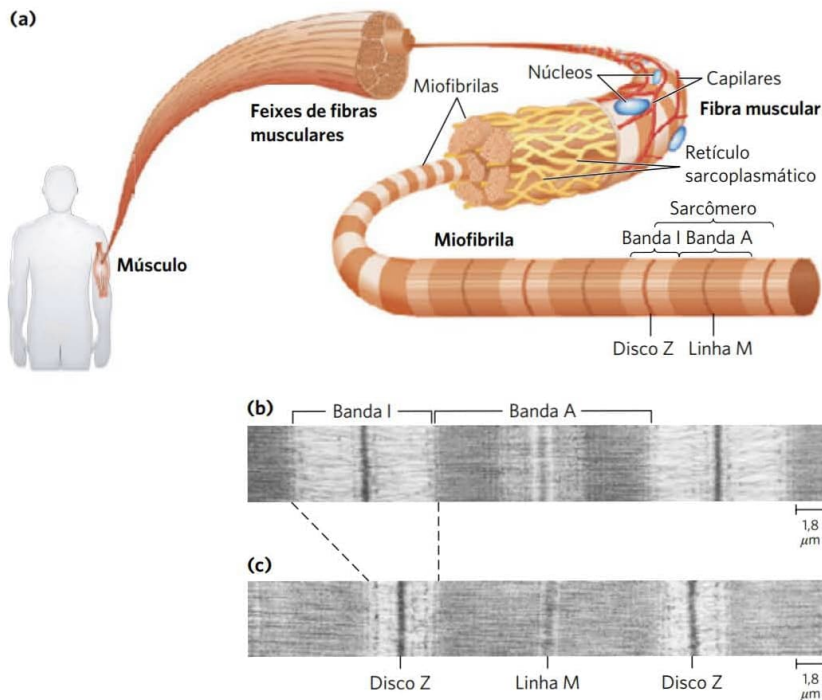
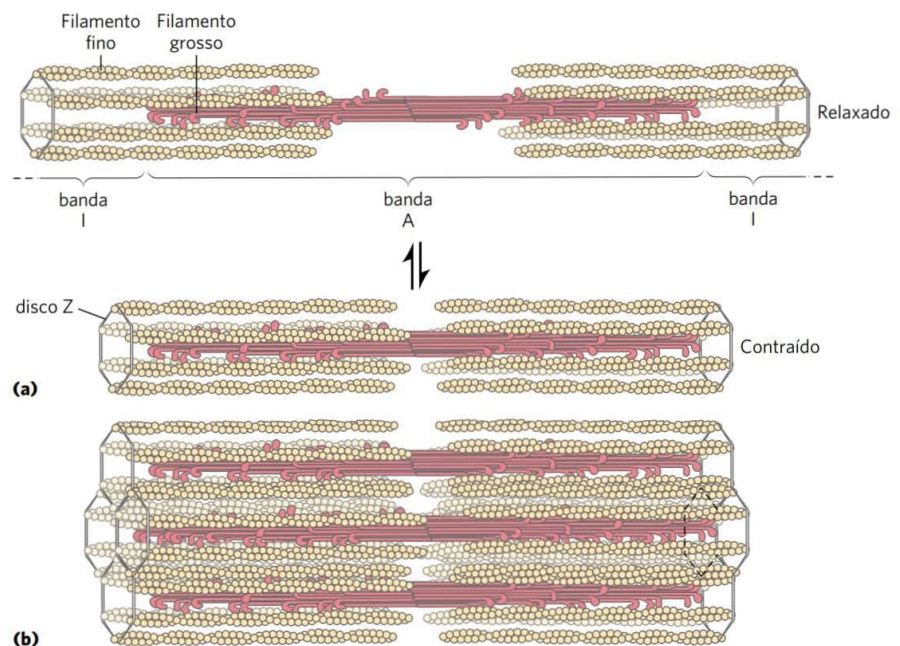


FIGURA 5-29 Músculo esquelético. (a) As fibras musculares são constituídas por células isoladas, alongadas e multinucleadas que se formam pela fusão de muitas células precursoras. Elas são compostas por muitas miofibrilas (para simplificar, a figura mostra somente seis) envolvidas pelo retículo sarcoplasmático membranoso. A organização dos filamentos finos e grossos confere à miofibrila uma aparência estriada. Quando o músculo se contrai, as bandas I estreitam-se e os discos Z aproximam-se, conforme pode ser visto nas micrografias eletrônicas do (b) músculo relaxado e do (c) músculo contraído. [Fonte: (b, c) James E. Dennis/Phototake.]

tos finos, servindo de âncora para a fixação desses filamentos. A banda A também é dividida por uma linha fina, a **linha M** ou disco M, uma região de alta densidade eletrônica no centro dos filamentos grossos. A unidade contrátil completa, que consiste em feixes de filamentos grossos intercalados nas duas extremidades com feixes de filamentos finos, é chamada de **sarcômero**. A organização dos feixes intercalados permite o deslizamento dos filamentos entre si (pelo mecanismo descrito a seguir), o que causa o encurtamento progressivo dos sarcômeros (**Figura 5-30**).

Os filamentos finos estão fixados ao disco Z por uma das extremidades, formando um padrão regular. O arranjo inclui proteínas musculares minoritárias, **α -actinina**, **desmina** e **vimentina**. Os filamentos finos também contêm uma grande proteína, chamada de **nebulina** (com cerca de 7.000 resíduos de aminoácidos), supostamente estruturada como uma α -hélice suficientemente longa para se estender por todo o comprimento do filamento. A linha M organiza os filamentos grossos de maneira semelhante. Eles contêm as proteínas **paramiosina**, **proteína C**

FIGURA 5-30 Contração muscular. Os filamentos grossos são estruturas bipolares criadas pela associação de muitas moléculas de miosina. (a) A contração muscular ocorre pelo deslizamento dos filamentos grossos sobre os finos, de forma que os discos Z em bandas I vizinhas se aproximam. (b) Os filamentos grossos e finos são intercalados, de modo que cada filamento grosso é circundado por seis filamentos finos.



e **proteína M**. Outra classe de proteínas chamada de **titinas**, a cadeia polipeptídica única mais longa descoberta até hoje (a titina do músculo cardíaco humano tem 26.926 resíduos de aminoácidos), liga os filamentos grossos ao disco Z, conferindo uma organização mais elaborada à estrutura global. Pensa-se que as proteínas nebulina e titina, entre outras funções, atuem como “régua molecular”, regulando, respectivamente, o comprimento dos filamentos finos e grossos. A titina estende-se do disco Z até a linha M, regulando o comprimento do próprio sarcômero e evitando a superextensão do músculo. O comprimento característico do sarcômero varia, nos vertebrados, de um tecido muscular para outro, principalmente devido às variantes diferentes de titina presentes nos tecidos.

Os filamentos grossos de miosina deslizam sobre os filamentos finos de actina

A interação entre a actina e a miosina, assim como a que existe entre todas as proteínas e seus ligantes, envolve ligações fracas. Quando o ATP não está ligado à miosina, uma face da cabeça se liga firmemente à actina (**Figura 5-31**). Quando o ATP se liga, ocorre uma série de mudanças conformacionais coordenadas e cíclicas, nas quais a miosina libera a subunidade de actina F e se liga a outra subunidade mais distante ao longo do filamento fino.

O ciclo tem quatro etapas principais (**Figura 5-31**). Na etapa **1**, o ATP liga-se à miosina e uma fenda se abre na molécula, rompendo a interação actina-miosina e liberando a actina. Na etapa **2**, o ATP é hidrolisado, o que provoca uma mudança conformacional da miosina para um estado de “alta energia” que move a cabeça da miosina e muda a sua orientação em relação ao filamento fino. A miosina então se liga fracamente a uma subunidade de actina F mais próxima do disco Z em relação com a que foi liberada imediatamente antes. Assim que o fosfato produzido na hidrólise do ATP é liberado da miosina na etapa **3**, ocorre outra mudança de conformação, na qual a fenda na miosina se fecha, fortalecendo a ligação actina-miosina. Isso é seguido rapidamente pela etapa **4**, “movimento de força” durante o qual a conformação da cabeça de miosina retorna ao estado de repouso original, mudando a sua orientação relativa à actina, de forma a puxar sua cauda na direção do disco Z. O ADP é, então, liberado e o ciclo se completa. Cada ciclo gera cerca de 3 a 4 pN (piconewtons) de força e move o filamento grosso de 5 a 10 nm sobre o filamento fino.

Uma vez que existem muitas cabeças de miosina em um filamento grosso, a cada momento algumas (provavelmente 1 a 3%) estão ligadas aos filamentos de actina. Isso impede que os filamentos grossos escorreguem para trás quando uma cabeça de miosina individual libera a subunidade de actina à qual estava ligada. Assim, o filamento grosso desliza ativamente à frente, passando sobre o filamento fino adjacente. Esse processo, coordenado entre os muitos sarcômeros em uma fibra muscular, produz a contração muscular.

A interação entre a actina e a miosina deve ser regulada de forma que a contração ocorra somente em resposta a sinais apropriados do sistema nervoso. A regulação é mediada por um complexo de duas proteínas, **tropomiosina** e **troponina** (**Figura 5-32**). A tropomiosina liga-se ao fila-

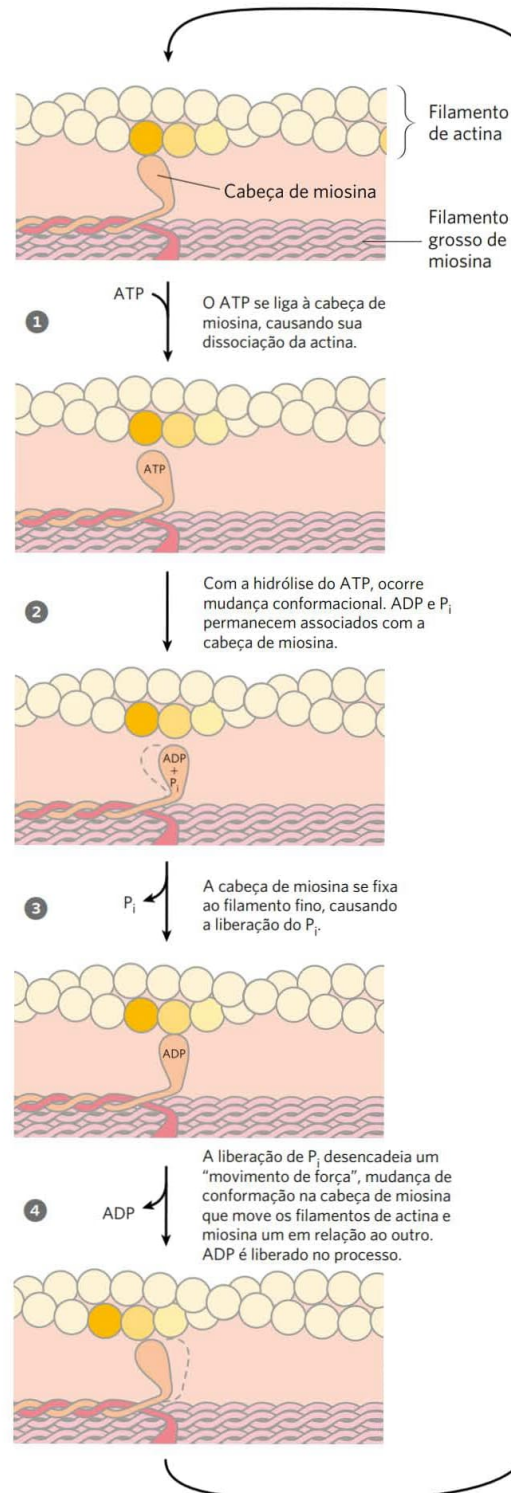


FIGURA 5-31 Mecanismo molecular da contração muscular. Mudanças de conformação na cabeça de miosina acopladas a estágios do ciclo hidrolítico do ATP fazem a miosina se dissociar sucessivamente de uma unidade de actina e se associar com outra unidade mais distante ao longo do filamento. Dessa forma, as cabeças de miosina deslizam ao longo dos filamentos de actina, movendo o conjunto de filamentos grossos para dentro do conjunto de filamentos finos (ver Figura 5-30).

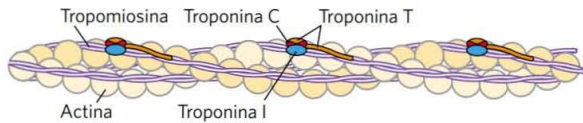


FIGURA 5-32 Regulação da contração muscular pela tropomiosina e a troponina. A tropomiosina e a troponina estão ligadas à actina F nos filamentos finos. No músculo relaxado, estas duas proteínas se organizam ao redor dos filamentos de forma a bloquear os sítios de ligação da miosina. A tropomiosina é formada por duas fitas de α -hélices enroladas da mesma forma que o motivo estrutural da α -queratina (ver Figura 4-11). Ela forma polímeros cabeça-cauda que se enrolam ao redor de duas cadeias de actina. A troponina liga-se ao complexo actina-tropomiosina em intervalos regulares de 38,5 nm. A troponina consiste em três subunidades diferentes: I, C e T. A troponina I impede a ligação da cabeça de miosina à actina, a troponina C tem um sítio de ligação para Ca^{2+} e a troponina T liga todo o complexo à tropomiosina. Quando o músculo recebe um sinal neural para iniciar a contração, o Ca^{2+} é liberado do retículo sarcoplasmático (ver Figura 5-29a) e se liga à troponina C. Isso provoca uma mudança conformacional na troponina C que altera as posições da troponina I e da tropomiosina e libera a inibição pela troponina I, permitindo a contração muscular.

mento fino, bloqueando os sítios de acoplamento à cabeça de miosina. A troponina é uma proteína que liga Ca^{2+} . O impulso nervoso provoca a liberação de íons Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático. O íon liberado liga-se à troponina (mais uma interação proteína-ligante) e causa mudança conformacional nos complexos tropomiosina-troponina, expondo os sítios de ligação à miosina nos filamentos finos. A seguir há a contração.

O músculo esquelético em atividade requer dois tipos de funções moleculares que são comuns nas proteínas – ligação e catálise. A interação actina-miosina, que é uma interação proteína-ligante semelhante à das imunoglobulinas com o antígeno, é reversível e não altera os participantes. Quando o ATP se liga à miosina, no entanto, ele é hidrolisado a ADP e P_i . A miosina não é somente uma proteína de ligação à actina, ela é também uma ATPase – uma enzima. A função das enzimas na catálise das transformações químicas é o assunto do próximo capítulo.

RESUMO 5.3 Interações proteicas moduladas por energia química: actina, miosina e motores moleculares

- As interações proteína-ligante chegam a um grau muito especial de organização temporal e espacial com as proteínas motoras. A contração muscular resulta de interações entre a miosina e a actina, acopladas à hidrólise do ATP pela miosina.
- A miosina consiste em duas cadeias pesadas e quatro cadeias leves, formando um domínio espiralado enrolado fibroso (cauda) e um domínio globular (cabeça). As moléculas de miosina são organizadas em filamentos grossos que deslizam sobre os filamentos finos, compostos principalmente por actina. A hidrólise do ATP na miosina é acoplada a uma série de mudanças conformacionais na cabeça da miosina, levando a que se dissocie de uma subunidade da actina F e se associe com outra, mais distante ao longo do filamento fino. Assim, a miosina desliza ao longo dos filamentos de actina.

- A contração muscular é estimulada pela liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático. O Ca^{2+} liga-se à proteína troponina, provocando uma mudança na conformação do complexo troponina-tropomiosina que desencadeia o ciclo de interações actina-miosina.

Termos-chave

Termos em negrito estão definidos no glossário.

ligante 157	imunoglobulina 174
sítio de ligação 157	linfócito B ou célula B 174
encaixe induzido 157	linfócito T ou célula T 174
hemoglobina 158	antígeno 175
heme 158	epítipo 175
porfirinas 158	hapteno 175
hemeproteína 158	enovelamento das imunoglobulinas 176
globinas 159	anticorpos policlonais 177
expressão de equilíbrio 160	anticorpos monoclonais 177
constante de associação, K_a 160	ELISA 178
constante de dissociação (K_d) 160	imunoblot 178
proteína alostérica 166	Western blot 178
modulador 166	miosina 179
equação de Hill 167	actina 179
efeito Bohr 170	sarcômero 181
resposta imune 174	
linfócitos 174	
anticorpos 174	

Teste seu conhecimento

- 1. Relação entre afinidade e constante de dissociação.** A proteína A tem um sítio de ligação ao ligante X com K_d de 10^{-6} M. A proteína B tem um sítio de ligação ao ligante X com K_d de 10^{-9} M. Qual delas tem maior afinidade pelo ligante X? Explique o raciocínio utilizado. Converta K_d em K_a para ambas as proteínas.
- 2. Cooperatividade negativa.** Qual das seguintes situações produz uma curva de Hill com $n_H < 1,0$? Explique o raciocínio para cada um dos casos abaixo.
 - (a) A proteína tem múltiplas subunidades, cada uma com um único sítio de interação com o ligante. A ligação a um sítio reduz a afinidade dos outros sítios pelo ligante.
 - (b) A proteína é uma cadeia polipeptídica única com dois sítios de ligação e cada um tem uma afinidade diferente pelo ligante.
 - (c) A proteína é uma cadeia polipeptídica única com um único sítio de ligação. Quando purificada, a preparação proteica é heterogênea, contendo algumas moléculas parcialmente desnaturadas e, assim, com afinidade mais baixa pelo ligante.
- 3. Afinidade da hemoglobina pelo oxigênio.** Qual é o efeito das seguintes mudanças sobre a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio? (a) Redução no pH do plasma sanguíneo de 7,4 para 7,2. (b) Redução na pressão parcial de CO_2 no pulmão de 6 kPa

(segurar a respiração) para 2 kPa (respiração normal). (c) Aumento no nível de BPG de 5 M (nível do mar) para 8 M (grande altitude). (d) Aumento no CO de 1 parte por milhão (ppm) de uma atmosfera normal externa para 30 ppm em uma casa que tenha uma estufa a gás funcionando mal ou com vazamento.

4. Interação reversível com o ligante I. A proteína calneurina liga-se à proteína calmodulina com uma velocidade de associação de $8,9 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e uma constante geral de dissociação, K_d , de 10 nM. Calcule a taxa de dissociação, k_d , incluindo as unidades apropriadas.

5. Interação reversível com o ligante II. Uma proteína liga-se a um ligante L com K_d de 400 nM. Quanto de ligante está presente quando Y é (a) 0,25, (b) 0,6, (c) 0,95?

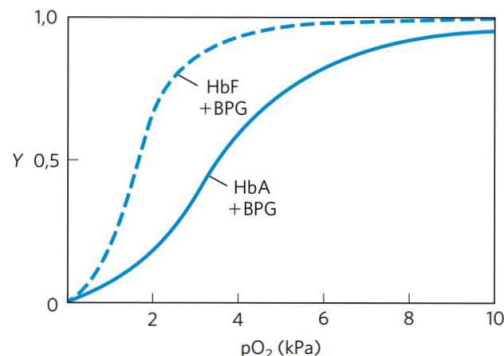
6. Ligante Reversível III. Três receptores proteicos de membrana se ligam firmemente a um hormônio. Com base nos dados da tabela abaixo, (a) qual é o valor de K_d para a ligação do hormônio pela proteína 2? (Coloque as unidades apropriadas.) (b) Qual dessas proteínas se liga *mais* firmemente ao seu hormônio?

Concentração de hormônio (nM)	Y		
	Proteína 1	Proteína 2	Proteína 3
0,2	0,048	0,29	0,17
0,5	0,11	0,5	0,33
1	0,2	0,67	0,5
4	0,5	0,89	0,8
10	0,71	0,95	0,91
20	0,83	0,97	0,95
50	0,93	0,99	0,98

7. Cooperatividade na hemoglobina. Sob condições adequadas, a hemoglobina se dissocia em suas quatro subunidades. A subunidade α isolada liga-se ao O_2 , mas a curva de saturação para o O_2 é hiperbólica e não sigmóide. Além disso, a ligação do oxigênio à subunidade α não é afetada pela presença de H^+ , CO_2 ou BPG. Qual dessas observações revela algo sobre a origem da cooperatividade na hemoglobina?

8. Comparação entre as hemoglobinas fetal e materna. Estudos sobre o transporte de oxigênio em mamíferos prenhes mostram que as curvas de saturação do O_2 do sangue fetal e do sangue materno são muito diferentes quando medidas sob as mesmas condições. Os eritrócitos do feto contêm uma variante estrutural da hemoglobina, HbF, formada por duas subunidades α e duas subunidades γ ($\alpha_2\gamma_2$), enquanto que os eritrócitos da mãe contêm HbA ($\alpha_2\beta_2$).

- Qual das hemoglobinas tem uma afinidade maior por O_2 em condições fisiológicas, HbA ou HbF? Explique.
- Qual é o significado fisiológico de haver afinidades diferentes pelo O_2 ?
- Quando todo o BPG é cuidadosamente removido das amostras de HbA e HbF, as curvas de saturação medidas (e, consequentemente, a afinidade pelo O_2) são deslocadas para a esquerda. Contudo, a HbA tem agora uma afinidade maior pelo oxigênio do que a HbF. Quando o BPG é reintroduzido, as curvas de saturação retornam ao normal, conforme mostrado no gráfico. Qual é o efeito do BPG sobre a afinidade da hemoglobina pelo O_2 ? Como as informações dadas podem ser usadas para explicar as diferentes afinidades das hemoglobinas fetal e materna?



9. Variantes da hemoglobina. Existem quase 500 variantes naturais da hemoglobina. A maioria delas é resultado da substituição de um único aminoácido em uma das cadeias polipeptídica da globina. Algumas variantes produzem doenças clínicas, embora nem todas tenham efeitos prejudiciais. A lista abaixo é uma pequena amostra.

- HbS (Hb falciforme): substitui um Glu por uma Val na superfície
 Hb Cowtown: elimina um par iônico envolvido na estabilização do estado T
 Hb Memphis: substitui um resíduo polar sem carga por outro de tamanho semelhante na superfície
 Hb Bibba: substitui uma Pro por uma Leu envolvida em uma α -hélice
 Hb Milwaukee: substitui um Glu por uma Val
 Hb Providence: substitui uma Asn por uma Lys que normalmente se projeta para a cavidade central do tetrâmero
 Hb Philly: substitui Phe por Tyr, rompendo uma ligação de hidrogênio na interface $\alpha_1\beta_1$

Explique suas escolhas para cada uma das seguintes afirmações:

- A Hb variante com *menos* probabilidade de causar sintomas patológicos.
- A(s) variante(s) mais provável(eis) de mostrar(em) valores de pI diferentes dos da HbA em um gel de focalização isoeletrica.
- A(s) variante(s) mais provável(eis) de mostrar(em) uma redução na ligação ao BPG e um aumento na afinidade total pelo oxigênio.

10. Ligação do oxigênio e a estrutura da hemoglobina. Um grupo de bioquímicos usou técnicas de engenharia genética para modificar a região da interface entre as subunidades da hemoglobina. A hemoglobina variante resultante existe em solução principalmente como dímeros $\alpha\beta$ e poucas, se é que existem, formas tetraméricas $\alpha_2\beta_2$. Essas variantes são capazes de ligar oxigênio de forma mais fraca ou mais forte? Explique a resposta.

11. Ligação reversível (porém forte) a um anticorpo. Um anticorpo liga um antígeno com K_d de $5 \times 10^{-8} \text{ M}$. Em quais concentrações de antígenos Y será (a) 0,2, (b) 0,5, (c) 0,6, (d) 0,8?

12. O uso de anticorpos para prospectar a relação estrutura-função nas proteínas. Um anticorpo monoclonal se liga à actina G, mas não à actina F. O que isso informa sobre o epítipo reconhecido pelo anticorpo?



13. O sistema imune e as vacinas. Um organismo hospedeiro necessita de tempo, em geral alguns dias, para

montar uma resposta imune contra um antígeno novo, mas as células de memória permitem uma resposta rápida contra patógenos previamente encontrados. Uma vacina para proteger contra uma determinada infecção viral em geral consiste no vírus atenuado ou morto ou em proteínas isoladas da capa proteica do vírus. A vacina, quando injetada em uma pessoa, geralmente não causa infecção ou doença, mas “ensina” o sistema imune a reconhecer a partícula viral como um patógeno, estimulando a produção de células de memória. Em uma infecção subsequente, essas células podem se ligar ao vírus e desencadear uma resposta imune rápida. Alguns patógenos, incluindo o HIV, desenvolveram mecanismos para escapar da resposta imune, tornando difícil ou impossível o desenvolvimento de vacinas efetivas contra eles. Que estratégia um patógeno usaria para escapar do sistema imune? Suponha que os anticorpos e/ou os receptores de células T do hospedeiro estejam disponíveis para se ligar a qualquer estrutura na superfície do patógeno e que, uma vez ligados, o patógeno é destruído.

14. Como o ser humano passa a ser um “cadáver”. Quando um organismo vertebrado morre, seus músculos enrijecem, pois são privados de ATP, estado chamado rigor mortis. Explique as bases moleculares do rigor mortis usando o conhecimento do ciclo catalítico da miosina na contração muscular apresentado acima.

15. Os sarcômeros a partir de outro ponto de vista. A simetria dos filamentos finos e grossos em um sarcômero é tal que geralmente seis filamentos finos circundam um filamento grosso em um arranjo hexagonal. Desenhe um corte transversal de uma miofibrila nos seguintes pontos: (a) na linha M; (b) através da banda I; (c) através da região densa da banda A; (d) através da região menos densa da banda A adjacente à linha M (ver Figura 5-29b, c).

Bioquímica Online

16. Lisozima e anticorpos. Para entender completamente como as proteínas funcionam em uma célula, é importante ter uma visão tridimensional de como as proteínas interagem com outros componentes celulares. Felizmente, isto é possível utilizando os bancos de dados de proteínas disponíveis na internet e pelas vantagens da visualização tridimensional de moléculas que o visualizador Jmol possibilita, um visualizador grátis, fácil de usar e compatível com a maioria dos sistemas operacionais e navegadores.

Neste exercício, as interações entre a enzima lisozima (Capítulo 4) e a porção Fab do anticorpo antilisoizima serão examinadas. Use o identificador PDB 1FDL para explorar a estrutura do complexo lisozima-fragmento Fab da IgG1 (complexo antígeno-anticorpo). Para responder às seguintes questões, use a informação da página Structure Summary no Protein Data Bank (www.rcsb.org) e examine a estrutura usando Jmol ou um visualizador similar.

- No modelo tridimensional, qual das cadeias corresponde ao fragmento do anticorpo e qual corresponde ao antígeno, lisozima?
- Que tipo de estrutura secundária predomina neste fragmento Fab?
- Quanto resíduos de aminoácidos existem nas cadeias leves e nas cadeias pesadas do fragmento Fab? E na lisozima? Estime a porcentagem da lisozima que interage com o sítio de ligação ao antígeno do fragmento do anticorpo.

- Identifique os resíduos específicos de aminoácidos na lisozima e nas regiões variáveis das cadeias leves e pesadas do Fab que estão na interface antígeno-anticorpo. Os resíduos estão contíguos na sequência primária das cadeias polipeptídicas?

17. Explorando Anticorpos no Protein Data Bank. Use o artigo PDB Molecule of the Month em www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=21 para fazer os próximos exercícios.

- Quanto sítios de ligação antígenos-específicos existem na primeira imagem de imunoglobulina da página da Web (imagem obtida de PDB ID 1IGT)?
- Após um vírus invadir um pulmão, quanto tempo leva para que uma pessoa produza um ou mais anticorpos contra o vírus?
- Aproximadamente, quantos tipos de anticorpos diferentes estão presentes no sangue de uma pessoa?
- Explore a estrutura da molécula de imunoglobulina (PDB ID 1IGT) na página da Web clicando no link do artigo ou vá diretamente para www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1igt. Use uma das imagens de estrutura fornecida pelo PDB para criar uma estrutura de fita dessa imunoglobulina. Identifique as duas cadeias leves e as duas cadeias pesadas, dando cores diferentes.

Problema de análise de dados

18. Função Proteica. Durante a década de 1980, as estruturas da actina e da miosina eram conhecidas somente na resolução mostrada na Figura 5-28a, b. Embora os pesquisadores soubessem que a porção S1 da miosina se liga à actina e hidrolisa ATP, existia um grande debate sobre onde era gerada a força de contração na molécula da miosina. Nessa época, foram propostos dois modelos diferentes para o mecanismo de geração de força.

No modelo da “dobradiça”, S1 se liga à actina, mas a força de tração era gerada pela contração da “região de dobradiça” na cauda de miosina. A região da dobradiça se localiza na cadeia pesada da porção meromiosina da molécula de miosina, perto de onde a tripsina cliva liberando a meromiosina leve (ver Fig. 5-17 b); grosseiramente é o ponto marcado “Duas α -hélices supertorcidas na Figura 5-27a. No modelo “S1”, a força de tração é gerada na própria “cabeça” de S1 e a cauda serve somente para suporte estrutural.

Foram feitos muitos experimentos sem que se conseguisse uma evidência conclusiva. Em 1987, na Universidade de Stanford, James Spudich e colaboradores publicaram um estudo que, embora inconclusivo, contribuiu para a resolução dessa controvérsia.

As técnicas de DNA recombinante não estavam suficientemente desenvolvidas para tratar este problema in vivo, de modo que Spudich e colaboradores usaram um ensaio interessante de motilidade in vitro. A alga *Nitella* tem células extremamente longas, geralmente vários centímetros de comprimento e cerca de 1 nm de diâmetro. Essas células têm fibras de actina ao longo do eixo maior e essas células podem ser cortadas ao longo do comprimento para expor as fibras. Spudich e seu grupo de pesquisa observaram que esferas revestidas com miosina “caminhavam” ao longo dessas fibras na presença de ATP, exatamente como a miosina faz no músculo em contração.

Para realizar esses experimentos os cientistas usaram um método bem definido para ligar miosina nas esferas. As “esfe-

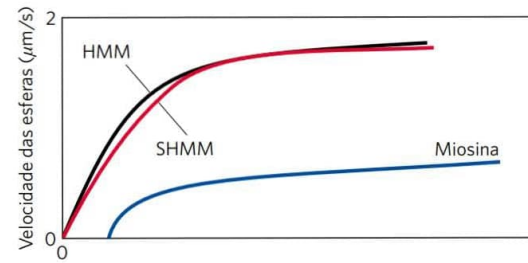
ras" eram agrupamentos de células de bactérias mortas (*Staphylococcus aureus*). Essas células têm na sua superfície uma proteína que se liga à região Fc das moléculas de anticorpo (Figura 5-21a). Os anticorpos, por sua vez, ligam-se a vários locais (não conhecidos) ao longo da cauda da molécula de miosina. Os complexos esfera-anticorpo-miosina preparados com moléculas intactas de miosina se moveram ao longo das fibras de actina de *Nitella* na presença de ATP.

- Faça um desenho esquemático mostrando a aparência do complexo esfera-anticorpo-miosina no nível molecular.
- Por que é necessário ATP para as esferas se moverem ao longo das fibras de actina?
- Spudich e colaboradores usaram anticorpos que se ligam à cauda de miosina. Por que esse experimento não teria sucesso caso fosse usado um anticorpo que interagisse com a porção de S1 que normalmente se liga à actina? Porque esse experimento teria falhado se eles tivessem usado um anticorpo que liga actina?

Para ajudar a focar na parte da miosina que é responsável pela produção da força, Spudich e seus colegas usaram tripsina para produzir duas moléculas incompletas de miosina (Fig. 5-27b): (1) meromiosina pesada (HMM), obtida por digestão branda da miosina por tripsina; HMM consiste em S1 mais a parte da cauda que inclui a dobradiça e (2) meromiosina pesada curta (SHMM), obtida por digestão mais extensa da HMM. SHMM consiste em S1 mais uma parte mais curta da cauda que não inclui a dobradiça. Digestão rápida da miosina com tripsina produz HMM e meromiosina leve, pela quebra de uma única ligação peptídica específica na molécula da miosina.

- Por que a tripsina ataca essa ligação peptídica antes de qualquer outra na miosina?

Spudich e colaboradores prepararam complexos de esfera-anticorpo-miosina com quantidades variáveis de miosina, HMM e SHMM e mediram as velocidades com que se deslocavam ao longo das fibras de actina da *Nitella* na presença de ATP. O gráfico abaixo mostra esses resultados.



Densidade da miosina ou dos fragmentos de miosina ligados às esferas

- Qual dos modelos ("S1" ou "dobradiça") é consistente com esses resultados? Explique o raciocínio utilizado.
 - Proponha uma explicação plausível para o aumento da velocidade das esferas que ocorre quando a densidade de miosina aumenta.
 - Proponha uma explicação plausível para o platô que ocorre na curva da velocidade das esferas quando a densidade de miosina é alta.
- A digestão mais extensa pela tripsina, necessária para a produção de SHMM, tem um efeito colateral: ocorre outra quebra específica do esqueleto polipeptídico da miosina além da quebra na cauda. Essa segunda quebra ocorre na cabeça S1.
- Porque o fato de que SHMM ainda poder movimentar as esferas ao longo das fibras de actina foi uma surpresa?
 - Como se confirmou, a estrutura terciária da cabeça S1 permanece intacta na SHMM. Dê uma explicação plausível para o fato de a proteína permanecer intacta e funcional mesmo que o esqueleto polipeptídico tenha sido rompido e não seja mais contínuo.

Referência

Hynes, T.R., S.M. Block, B.T. White e J.A. Spudich. 1987. Movement of myosin fragments in vitro: domains involved in force production. *Cell* 48:953–963.

Enzimas

- 6.1 Introdução às enzimas 187
- 6.2 Como as enzimas funcionam 190
- 6.3 A cinética enzimática como abordagem para compreender mecanismos 198
- 6.4 Exemplos de reações enzimáticas 213
- 6.5 Enzimas regulatórias 225

Só há vida se duas condições básicas forem preenchidas. Primeiro, o organismo deve ser capaz de se autorreplicar (tópico considerado na Parte III); segundo, ele deve ser capaz de catalisar reações químicas com eficiência e seletividade. Embora possa parecer que o papel central da catálise não seja evidente, ele é fácil de demonstrar. Como foi descrito no Capítulo 1, os sistemas vivos fazem uso da energia do ambiente. Grande parte da população humana, por exemplo, consome quantidades substanciais de sacarose (o açúcar comum) como combustível, geralmente na forma de comidas e bebidas doces. A conversão de sacarose em CO_2 e H_2O , em presença de oxigênio, é um processo altamente exergônico, liberando energia livre que pode ser usada para pensar, mover-se, sentir gostos e enxergar. Entretanto, um saco de açúcar pode permanecer na prateleira por anos a fio sem ser convertido em CO_2 e H_2O . Embora esse processo químico seja termodinamicamente favorável, ele é muito lento. Mesmo assim, quando a sacarose é consumida por seres humanos (ou por qualquer outro organismo), ela libera sua energia química em segundos. A diferença é a catálise. Sem catálise, as reações químicas, como aquelas da oxidação da sacarose, não poderão ocorrer na escala de tempo adequada e, então, não poderão sustentar a vida.

Neste capítulo, o foco se voltará para os catalisadores das reações dos sistemas biológicos: as enzimas, as proteínas mais notáveis e mais especializadas. As enzimas têm um poder catalítico extraordinário, geralmente muito maior do que os catalisadores sintéticos ou inorgânicos. Elas têm um alto grau de especificidade para os seus respectivos substratos, aceleram as reações químicas e atuam em soluções aquosas sob condições suaves de temperatura e pH. Poucos catalisadores não biológicos têm esse conjunto de propriedades.

As enzimas estão no centro de cada processo bioquímico. Agindo em sequências organizadas, elas catalisam cada

uma das reações das centenas de etapas que degradam as moléculas dos nutrientes, que conservam e transformam energia química e que constroem as macromoléculas biológicas a partir de precursores elementares.

O estudo das enzimas tem imensa importância prática. Em algumas doenças, sobretudo nas doenças genéticas hereditárias, pode haver uma deficiência ou mesmo ausência total de uma ou mais enzimas. Outras doenças podem ser causadas pela atividade excessiva de determinada enzima. A determinação das atividades de enzimas no plasma sanguíneo, nos eritrócitos ou em amostras de tecidos é importante para o diagnóstico de certas enfermidades. Muitos medicamentos agem por meio de interações com enzimas. As enzimas também são ferramentas importantes na engenharia química, tecnologia de alimentos e agricultura.

Este capítulo inicia descrevendo as propriedades das enzimas e os princípios que embasam seu poder catalítico, depois aborda a cinética enzimática, disciplina que fornece muito do arcabouço para qualquer discussão a respeito das enzimas. A seguir, serão dados exemplos dos mecanismos de ação das enzimas para ilustrar os princípios discutidos no início do capítulo. Por fim, o capítulo discute como a atividade das enzimas é regulada.

6.1 Introdução às enzimas

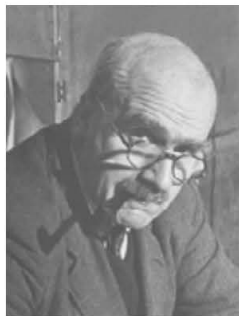
Boa parte da história da bioquímica é a história da pesquisa sobre enzimas. A catálise biológica foi reconhecida e descrita nos final dos anos 1700 em estudos da digestão de carne por secreções do estômago. A pesquisa continuou no século seguinte, examinando a conversão do amido em açúcar pela saliva e por vários extratos de plantas. Por volta de 1850, Louis Pasteur concluiu que a fermentação de açúcar em álcool por leveduras é catalisada por “fermentos”. Ele postulou que esses fermentos eram inseparáveis da estrutura das células vivas de leveduras. Este modo de ver, denominado vitalismo, prevaleceu por décadas. Então, em 1897, Eduard Buchner descreveu que extratos de levedura podiam fermentar açúcar em álcool, provando que a fermentação era feita por moléculas que continuavam ativas mesmo após serem removidas das células. Os experimentos de Buchner marcaram o fim das ideias do vitalismo e o alvorecer da ciência bioquímica. Posteriormente, Frederick W. Kühne deu o nome de **enzimas** (do grego, *enzymos*, “levado”) para as moléculas detectadas por Buchner.



Eduard Buchner, 1860-1917
[Fonte: Science Museum/
Science & Society Picture
Library.]



James Sumner, 1887-1955
[Fonte: ©Cortesia da
Division of Rare and
Manuscript Collections,
Carl A. Kroch Library,
Cornell University, Ithaca,
NY. RMC2005_1073.]



J. B. S. Haldane, 1892-1964
[Fonte: Hans Wild/The LIFE
Picture Collection/Getty
Images.]

O isolamento e a cristalização da urease por James Sumner, em 1926, constituiu-se em uma quebra de paradigma nos estudos iniciais sobre enzimas. Sumner descobriu que os cristais de urease são formados apenas por proteína e postulou que toda enzima é uma proteína. Na falta de outros exemplos, essa ideia permaneceu controversa por algum tempo. Somente na década de 1930 é que essa conclusão de Sumner foi amplamente aceita, após John Northrop e Moses Kunitz cristalizarem pepsina, tripsina e outras enzimas digestivas e descobrirem que todas elas são proteínas. Durante esse período, J. B. S. Haldane escreveu um tratado intitulado *Enzymes*. Embora a natureza molecular das enzimas não estivesse totalmente reconhecida, Haldane fez a notável proposta de que ligações fracas entre a enzima e o seu substrato poderiam ser usadas para catalisar a reação. Essa ideia ainda continua essencial no conhecimento atual da catálise enzimática.

A partir da última parte do século XX, milhares de enzimas foram purificadas, as suas estruturas elucidadas e os seus mecanismos explicados.

A maioria das enzimas é proteína

Com exceção de poucas classes de moléculas de RNA catalíticas (Capítulo 26) todas as enzimas são proteínas. A atividade catalítica depende da integridade da conformação nativa. Se uma enzima for desnaturada ou dissociada separando as subunidades, geralmente a atividade catalítica é perdida. Se uma enzima for degradada até os aminoácidos que a compõem, a atividade catalítica é sempre destruída. Portanto, as estruturas proteicas primária, secundária, terciária e quaternária das enzimas são essenciais para a atividade catalítica.

As enzimas, assim como as demais proteínas, têm pesos moleculares que variam entre cerca de 12.000 e mais de um milhão. Algumas enzimas não necessitam de outros grupos químicos além dos próprios resíduos de aminoácidos. Outras necessitam de um componente químico adicional, denominado **cofator**, que pode ser um ou mais íons inorgânicos, como Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} ou Zn^{2+} (Tabela 6-1), ou

uma molécula orgânica ou metalorgânica complexa, denominada **coenzima**. As coenzimas agem como carreadores transitórios de grupos funcionais específicos (Tabela 6-2). A maioria delas é derivada das vitaminas, nutrientes orgânicos que precisam estar presentes em pequenas quantidades na dieta. As coenzimas serão estudadas com mais detalhes à medida que forem aparecendo nas vias metabólicas discutidas na Parte II. Algumas enzimas necessitam *tanto* de uma coenzima *quanto* de um ou mais íons metálicos para terem atividade. Uma coenzima ou um íon metálico que se ligue muito firmemente, ou mesmo covalentemente, a uma enzima é denominado **grupo prostético**. Uma enzima completa, cataliticamente ativa, junto com a sua coenzima e/ou íons metálicos, é denominada **holoenzima**. A parte proteica de uma dessas enzimas é denominada **apoenzima** ou **apoproteína**.

Por fim, algumas enzimas são modificadas covalentemente por fosforilação, glicosilação ou outros processos. Muitas dessas modificações estão envolvidas na regulação da atividade enzimática.

As enzimas são classificadas segundo as reações que catalisam

Muitas enzimas receberam seus nomes pela adição do sufixo “ase” ao nome dos respectivos substratos ou por uma palavra que descreve a atividade. Assim, a urease catalisa a hidrólise da ureia e a DNA-polimerase catalisa a polimerização de nucleotídeos para formar DNA. Outras enzimas foram batizadas pelos seus descobridores devido a uma função ampla, antes que se conhecesse a reação específica catalisada por elas. Por exemplo, uma enzima conhecida por atuar na digestão de alimentos foi denominada pepsina, do grego *pepsis* (digestão). A lisozima recebeu

TABELA 6-1 Alguns íons inorgânicos que servem de cofatores para enzimas

Íons	Enzimas
Cu^{2+}	Citocromo-oxidase
Fe^{2+} ou Fe^{3+}	Citocromo-oxidase, catalase, peroxidase
K^{+}	Piruvato-cinase
Mg^{2+}	Hexocinase, glicose-6-fosfatase, piruvato-cinase
Mn^{2+}	Arginase, ribonucleotídeo-redutase
Mo	Dinitrogenase
Ni^{2+}	Urease
Zn^{2+}	Anidrase carbônica, álcool-desidrogenase, carboxipeptidases A e B

TABELA 6-2 Algumas coenzimas que servem como carreadores transitórios de átomos ou grupos funcionais específicos

Coenzima	Exemplo de grupo químico transferido	Precursor presente na dieta de mamíferos
Biotina	CO ₂	Biotina
Coenzima A	Grupos acila	Ácido pantotênico e outros compostos
5'-Desoxiadenosilcobalamina (coenzima B ₁₂)	Átomos de H e grupos alquila	Vitamina B ₁₂
Flavina-adenina-dinucleotídeo	Elétrons	Riboflavina (vitamina B ₂)
Lipoato	Elétrons e grupos acila	Não é necessário na dieta
Nicotinamida-adeninadinucleotídeo	Íon hidreto (:H ⁻)	Ácido nicotínico (niacina)
Piridoxal-fosfato	Grupos amino	Piridoxina (vitamina B ₆)
Tetra-hidrofolato	Grupos de um carbono	Folato
Tiamina-pirofosfato	Aldeídos	Tiamina (vitamina B ₁)

Nota: as estruturas e os modos de ação dessas coenzimas estão descritos na Parte II.

esse nome devido à sua capacidade de lisar (degradar) a parede de bactérias. Algumas foram denominadas com base na fonte de onde foram obtidas: a tripsina, denominada, em parte, do grego *tryein* (desgastar), foi obtida esfregando-se tecido pancreático com glicerina. Às vezes, a mesma enzima tem dois ou mais nomes, ou duas enzimas têm o mesmo nome. Devido a essa ambiguidade e ao crescimento no número de enzimas que são descobertas, os bioquímicos fizeram um acordo internacional, criando um sistema de nomenclatura e classificação das enzimas. Esse sistema divide as enzimas em seis classes, cada uma com subclasses, com base no tipo de reações que catalisam (Tabela 6-3). Um número de classificação de quatro partes e um nome sistemático, que identifica a reação catalisada, são designados para cada enzima. Como exemplo, o nome sistemático da enzima que catalisa a reação



ATP:D-hexose-6-fosfotransferase indica que ela catalisa a transferência de um grupo fosforila do ATP para a glicose. O número dessa enzima na Comissão de Enzimas (número E. C., do inglês, *Enzyme Commission*) é 2.7.1.1. O primeiro número (2) indica o nome da classe (transferase); o segundo número (7), a subclasse (fosfotransferase); o ter-

ceiro número (1), uma fosfotransferase que tem um grupo hidroxila como aceptor; e o quarto número (1), D-glicose como o aceptor do grupo fosforila. No caso de muitas enzimas, é mais comum usar um nome trivial, hexocinase, nesse caso específico. Uma lista completa com a descrição das milhares de enzimas conhecidas é mantida pelo Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme). Este capítulo se dedica principalmente aos princípios e às propriedades comuns a todas as enzimas.

RESUMO 6.1 Introdução às enzimas

- A vida depende de catalisadores poderosos e específicos: as enzimas. Praticamente todas as reações bioquímicas são catalisadas por enzimas.
- Com a exceção de poucos RNA catalíticos, todas as enzimas conhecidas são proteínas. Muitas necessitam de coenzimas ou cofatores não proteicos para exercerem a atividade catalítica.
- As enzimas são classificadas segundo o tipo de reação que catalisam. Todas as enzimas têm número E. C. e nome formais. Muitas têm nomes comuns.

TABELA 6-3 Classificação internacional das enzimas

Classe nº	Nome da classe	Tipo de reação catalisada
1	Oxidoredutases	Transferência de elétrons (íons hidreto ou átomos de H)
2	Transferases	Reações de transferência de grupos
3	Hidrolases	Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais para a água)
4	Liasas	Clivagem de C—C, C—O, C—N ou outras ligações por eliminação, rompimento de ligações duplas ou anéis, ou adição de grupos a ligações duplas.
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro de uma mesma molécula, produzindo formas isoméricas
6	Ligases	Formação de ligações C—C, C—S, C—O e C—N por reações de condensação acopladas à hidrólise de ATP ou cofatores similares

6.2 Como as enzimas funcionam

A catálise enzimática das reações é essencial para os sistemas vivos. Nas condições biológicas relevantes, as reações não catalisadas tendem a ser lentas – a maioria das moléculas biológicas é muito estável nas condições internas das células com pH neutro, temperaturas amenas e ambiente aquoso. Além disso, muitos processos químicos corriqueiros, como a formação transitória de intermediários instáveis carregados ou a colisão de duas ou mais moléculas na orientação perfeitamente exata necessária para que as reações ocorram, são desfavoráveis ou improváveis no ambiente celular. As reações necessárias para digerir os alimentos, enviar sinais nervosos ou contrair os músculos simplesmente não ocorrem em velocidades adequadas sem catálise.

As enzimas contornam esses problemas ao proporcionar um ambiente específico adequado para que uma dada reação possa ocorrer mais rapidamente. A propriedade característica das reações catalisadas por enzimas é que a reação acontece confinada em um bolsão da enzima, denominado **sítio ativo** (Figura 6-1). A molécula que se liga no sítio ativo e sobre a qual a enzima age é denominada **substrato**. O contorno da superfície do sítio ativo é delimitado por resíduos de aminoácidos com grupos nas cadeias laterais que ligam o substrato e que catalisam a sua transformação química. Com frequência, o sítio ativo engloba o substrato, sequestrando-o completamente da solução. O complexo enzima-substrato, cuja existência foi proposta pela primeira vez por Charles-Adolphe Wurtz, em 1880, é o ponto central da ação das enzimas. Também é o ponto de partida para o tratamento matemático que define o comportamento cinético das reações catalisadas por enzimas e para a descrição teórica dos mecanismos das enzimas.

As enzimas alteram a velocidade da reação, não o seu equilíbrio

Uma reação enzimática simples pode ser escrita como

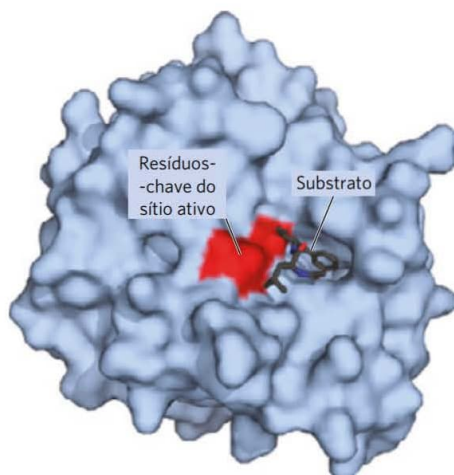
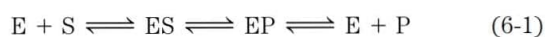


FIGURA 6-1 Ligação de um substrato no sítio ativo de uma enzima. A enzima quimotripsina com o substrato ligado. Alguns dos resíduos-chave do sítio ativo aparecem como uma mancha vermelha na superfície da enzima. [Fonte: PDB ID 7GCH, K. Brady et al., *Biochemistry* 29:7600, 1990.]

em que E, S e P representam enzima, substrato e produto; ES e EP são complexos transitórios da enzima com o substrato e com o produto.

Para entender a catálise, deve-se primeiro avaliar a importância de diferenciar equilíbrio da reação e velocidade de uma reação. A função do catalisador é aumentar a *velocidade* da reação. A catálise não afeta o *equilíbrio* da reação. (Lembre-se de que uma reação está em equilíbrio quando as concentrações dos produtos e dos reagentes não variam.) Qualquer reação, como $S \rightleftharpoons P$, pode ser descrita por um diagrama de coordenadas da reação (Figura 6-2), que é uma representação da variação de energia que ocorre durante a reação. Energia é descrita nos sistemas biológicos, como foi discutido no Capítulo 1, em termos de energia livre, G . No diagrama de coordenadas da reação, a energia livre do sistema é colocada no gráfico em função do andamento da reação (a coordenada da reação). O ponto de partida tanto da reação direta quanto da reação reversa é denominado **estado fundamental**, a contribuição que uma molécula média (S ou P) dá para a energia livre do sistema, sob dadas condições.

>> Convenção-chave: os químicos, para definirem a variação da energia livre das reações, definiram um conjunto padrão de condições (temperatura de 298 K; pressão parcial de cada gás de 1 atm, ou 101,3 kPa; concentração de cada reagente de 1 M) e expressão da variação de energia livre de um sistema reagindo nessas condições como ΔG° , a **variação de energia livre padrão**. Devido ao fato de que os sistemas biológicos geralmente envolvem concentrações de H^+ muito abaixo de 1 M, os bioquímicos definiram uma **variação de energia livre padrão bioquímica**, $\Delta G'^\circ$. Ao longo deste livro, usa-se a variação de energia livre padrão em $pH\ 7,0$. Uma definição mais completa de $\Delta G'^\circ$ é dada no Capítulo 13. <<

O equilíbrio entre S e P reflete a diferença entre as energias livres dos seus estados fundamentais. No exemplo mostrado na Figura 6-2, a energia livre do estado fundamental de P é menor do que a de S, e, então, $\Delta G'^\circ$ para a reação é negativa (reação exergônica) e o equilíbrio favorece mais P que S. Os catalisadores *não* afetam nem o ponto de equilíbrio e nem a direção do equilíbrio.

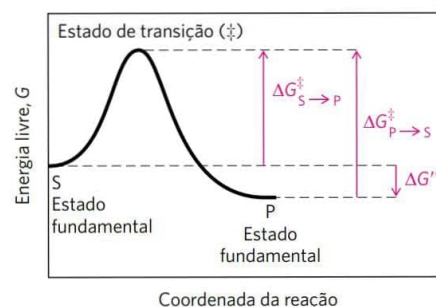


FIGURA 6-2 Diagrama da coordenada da reação. A energia livre do sistema está colocada no gráfico *versus* o progresso da reação $S \rightarrow P$. Diagramas desse tipo descrevem as mudanças de energia durante a reação. O eixo horizontal (coordenada da reação) reflete as mudanças químicas progressivas (p. ex., quebra ou formação da ligação) que ocorrem à medida que S é convertido em P. As energias de ativação, ΔG^\ddagger , para as reações $S \rightarrow P$ e $P \rightarrow S$ estão indicadas. $\Delta G'^\circ$ é a variação de energia livre padrão final na direção $S \rightarrow P$.

Um equilíbrio favorável não significa que a conversão $S \rightarrow P$ ocorra a uma velocidade detectável. A *velocidade* da reação depende de um parâmetro totalmente diferente. Há uma barreira energética entre S e P. Essa barreira é a energia necessária para alinhar os grupos reagentes, para a formação de cargas instáveis transitórias, rearranjos de ligações e, ainda, outros rearranjos necessários para que a reação ocorra em qualquer direção. Isso é ilustrado pela curva de energia mostrada nas Figuras 6-2 e 6-3. Para que uma reação ocorra, as moléculas devem suplantam essa barreira e, portanto, atingir um nível de energia alto. O topo da curva de energia é um ponto a partir do qual o decaimento para o estado S ou para o estado P tem a mesma probabilidade de ocorrer (nos dois casos, a curva é descendente). Isso é denominado **estado de transição**. O estado de transição não é uma forma química com alguma estabilidade significativa e não deve ser confundido com os intermediários da reação (como ES ou EP). Ele é apenas um momento molecular fugaz no qual eventos como a quebra de uma ligação, a formação de uma ligação e a formação de uma carga acontecem exatamente neste ponto em que o desaparecimento do substrato ou o desaparecimento do produto tem a mesma probabilidade de acontecer. A diferença entre os níveis de energia livre dos estados fundamental e de transição é a **energia de ativação**, ΔG^\ddagger . A velocidade da reação reflete essa energia de ativação: uma energia de ativação maior corresponde a uma reação mais lenta. A velocidade da reação pode aumentar pela elevação da temperatura e/ou da pressão, uma vez que isso aumenta o número de moléculas com energia suficiente para suplantam a barreira energética. De modo alternativo, a energia de ativação pode ser diminuída pela adição de um catalisador (**Figura 6-3**). Os catalisadores aumentam a velocidade das reações por diminuírem as energias de ativação.

As enzimas não são exceções à regra de que os catalisadores não afetam o equilíbrio da reação. As flechas bidirecionais na Equação 6-1 indicam isto: qualquer enzima que catalise a reação $S \rightarrow P$ também catalisa a reação $P \rightarrow S$. O papel da enzima é *acelerar* a interconversão entre $P \rightarrow S$. A enzima não é gasta no processo e o ponto de equilíbrio não é afetado. Entretanto, a reação atinge o equilíbrio muito

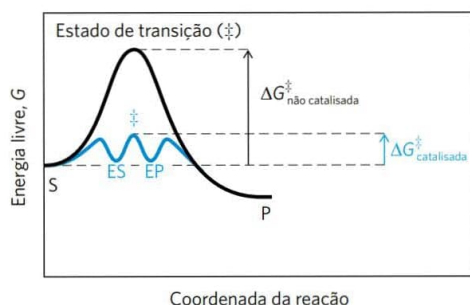


FIGURA 6-3 Diagrama da coordenada da reação comparando uma reação catalisada por enzima com uma não catalisada. Na reação $S \rightarrow P$, os intermediários ES e EP ocupam o nível mínimo na curva da progressão da energia de uma reação catalisada por uma enzima. Os termos $\Delta G^\ddagger_{\text{não catalisada}}$ e $\Delta G^\ddagger_{\text{catalisada}}$ correspondem à energia de ativação de uma reação não catalisada, e de uma reação catalisada por uma enzima, respectivamente. A energia de ativação é menor quando a reação é catalisada por uma enzima.

mais rapidamente quando uma enzima apropriada está presente, pois a velocidade da reação é aumentada.

Esse princípio geral pode ser ilustrado pela conversão de sacarose e oxigênio em dióxido de carbono e água:



Essa conversão, que ocorre por meio de uma série de reações separadas, tem uma ΔG° muito grande e negativa, sendo que, no ponto de equilíbrio, a quantidade de sacarose presente é desprezível. Ainda assim, a sacarose é um composto estável, visto que a barreira da energia de ativação que deve ser suplantada antes que reaja com oxigênio é bastante alta. A sacarose pode ser armazenada em um recipiente com oxigênio quase que indefinidamente sem reagir com ele. Nas células, entretanto, a sacarose é prontamente degradada em CO_2 e H_2O em uma série de reações catalisadas por enzimas. Essas enzimas não apenas aceleram as reações, mas também as organizam e as controlam, de modo que boa parte da energia liberada é recuperada em outras formas químicas, sendo disponibilizada para as células realizarem outras tarefas. A via de reações na qual a sacarose (e outros açúcares) é degradada constitui a via primária de produção de energia das células. As enzimas dessa via permitem que a sequência de reações ocorra em uma escala de tempo compatível biologicamente.

As reações podem ter várias etapas, incluindo a formação e o consumo de espécies químicas transitórias, denominadas **intermediários da reação**.* Um intermediário da reação é qualquer espécie molecular das etapas da reação que tenha uma vida química finita (maior do que a vibração molecular, $\sim 10^{-13}$ segundos). Quando a reação $S \rightleftharpoons P$ é catalisada por uma enzima, os complexos ES e EP podem ser considerados intermediários, mesmo que S e P sejam espécies químicas estáveis (Equação 6-1). Os complexos ES e EP ocupam vales no diagrama das coordenadas da reação (Figura 6-3). Além disso, no curso de uma reação catalisada por uma enzima geralmente existem intermediários químicos menos estáveis. A interconversão entre dois intermediários da reação que ocorrem em sequência constitui uma etapa da reação. Quando uma reação tem várias etapas, a velocidade final é determinada pela etapa (ou etapas) com a maior energia de ativação. Essa etapa é denominada **etapa limitante da velocidade**. Em um caso simples, a etapa limitante da velocidade é o ponto de maior energia no diagrama da interconversão entre S e P. Na prática, a etapa limitante da reação pode variar segundo as condições de reação, sendo que, para muitas enzimas, várias etapas podem ter energia de ativação similares. Isso significa que todas essas etapas são parcialmente limitantes da velocidade.

As energias de ativação são uma barreira de energia para as reações químicas. Essas barreiras são cruciais para a própria vida. A velocidade na qual uma molécula sofre uma determinada reação diminui à medida que a barreira da reação aumenta. Sem essas barreiras energéticas, as macro-

*Neste capítulo, *etapa* e *intermediário* referem-se a uma reação química e espécie química na via de uma única reação catalisada por uma enzima. No contexto das vias metabólicas que envolvem várias enzimas (discutido na Parte II), esses termos são usados de maneira um tanto diferente. Uma reação enzimática inteira geralmente é considerada como uma etapa da via, e o produto da reação de uma reação enzimática (que é o substrato da reação seguinte da via) é considerado como "intermediário" da via.

moléculas complexas poderiam reverter espontaneamente para formas moleculares mais simples, e, portanto, as estruturas complexas e altamente ordenadas e os processos metabólicos das células não poderiam existir. Durante o curso da evolução, as enzimas desenvolveram-se para diminuir *seletivamente* as energias de ativação das reações necessárias para a sobrevivência celular.

A velocidade e o equilíbrio da reação têm definições termodinâmicas precisas

O *equilíbrio* da reação está ligado inextricavelmente à variação da energia livre padrão da reação, $\Delta G'^{\circ}$, e a *velocidade* da reação está ligada à energia de ativação, ΔG^{\ddagger} . Uma introdução básica sobre essas relações termodinâmicas é a próxima etapa para compreender como as enzimas agem.

Um equilíbrio desses é descrito por uma **constante de equilíbrio**, K'_{eq} , ou simplesmente K (p. 25). Nas condições-padrão usadas para comparar os processos bioquímicos, a constante de equilíbrio é designada K'_{eq} (ou K'):

$$K'_{eq} = \frac{[P]}{[S]} \quad (6-2)$$

Na termodinâmica, K'_{eq} e $\Delta G'^{\circ}$ podem ser descritos por uma expressão

$$\Delta G'^{\circ} = -RT \ln K'_{eq} \quad (6-3)$$

em que R é a constante dos gases, 8,315 J/mol·K, e T é a temperatura absoluta, 298 K (25°C). A Equação 6-3 é desenvolvida e discutida com mais detalhes no Capítulo 13. No momento, o ponto importante é que a constante de equilíbrio está diretamente relacionada com o total da energia livre padrão da reação (Tabela 6-4). Um grande valor negativo de $\Delta G'^{\circ}$ reflete um equilíbrio de reação favorável (aquele em que há muito mais produto do que substrato em equilíbrio), porém, como foi observado, isso não significa que a reação ocorrerá com velocidade alta.

A velocidade de uma reação é determinada pela concentração do reagente (ou reagentes) e por uma **constante de velocidade**, normalmente designada por k . Para

uma reação unimolecular $S \rightarrow P$, a velocidade da reação, V (representando a quantidade de S que reage por unidade de tempo), é expressa por uma **equação de velocidade**:

$$V = k[S] \quad (6-4)$$

Nessa reação, a velocidade depende apenas da concentração de S , sendo uma reação de primeira ordem. O fator k é uma constante de proporcionalidade que reflete a probabilidade de que a reação ocorra em determinado conjunto de condições (pH, temperatura, etc.). Neste caso, k é uma constante de velocidade de primeira ordem e tem como unidade a recíproca do tempo, como s^{-1} . Se a constante de velocidade k de uma reação de primeira ordem for $0,03 s^{-1}$, isso pode ser interpretado (qualitativamente) como significando que em 1 segundo 3% do substrato disponível é convertido em produto. Uma reação com uma constante de velocidade de $2.000 s^{-1}$ acontecerá em uma pequena fração de segundo. Se a velocidade da reação depende das concentrações de dois compostos diferentes, ou se a reação ocorre entre duas moléculas do mesmo composto, a reação é de segunda ordem e k é a constante de velocidade de segunda ordem, com unidade $M^{-1}s^{-1}$. A equação da velocidade passa a ser

$$V = k[S_1][S_2] \quad (6-5)$$

A partir da teoria do estado de transição pode-se derivar uma expressão que relaciona a magnitude da constante de velocidade com a energia de ativação:

$$k = \frac{kT}{h} e^{-\Delta G^{\ddagger}/RT} \quad (6-6)$$

em que k é a constante de Boltzmann e h é a constante de Planck. No momento, o ponto importante é que a relação entre a constante de velocidade k e a energia de ativação ΔG^{\ddagger} é inversa e exponencial. Em termos simplificados, isso constitui a base para afirmar que uma energia de ativação mais baixa significa velocidade de reação rápida.

Depois de analisar *o que as enzimas fazem*, o foco será *como elas o fazem*.

Poucos princípios são suficientes para explicar o poder catalítico e a especificidade das enzimas

As enzimas são catalisadores extraordinários. O aumento de velocidade conferido pelas enzimas situa-se na faixa de 5 a 17 ordens de magnitude (Tabela 6-5). As enzimas também são muito específicas e são capazes de distinguir substratos com estruturas muito semelhantes. Como esse enorme e altamente seletivo aumento de velocidade pode ser explicado? Qual é a fonte de energia para essa grande diminuição nas energias de ativação de reações específicas?

A resposta para essas questões tem duas partes distintas, embora interligadas. A primeira parte baseia-se no rearranjo de ligações covalentes durante a reação catalisada pela enzima. Muitos tipos de reações químicas ocorrem entre substratos e grupos funcionais da enzima (cadeias específicas de aminoácidos, íons metálicos e coenzimas). Grupos funcionais catalíticos na enzima podem formar ligações covalentes transitórias com um substrato e ativá-lo para a reação, ou um grupo pode ser transitoriamente transferido do substrato para a enzima. Em geral, essas reações ocorrem apenas no sítio ativo da enzima. Interações covalentes

TABELA 6-4 Relação entre K'_{eq} e $\Delta G'^{\circ}$

K'_{eq}	$\Delta G'^{\circ}$ (kJ/mol)
10^{-6}	34,2
10^{-5}	28,5
10^{-4}	22,8
10^{-3}	17,1
10^{-2}	11,4
10^{-1}	5,7
1	0,0
10^1	-5,7
10^2	-11,4
10^3	-17,1

Nota: a relação é calculada a partir de $\Delta G'^{\circ} = -RT \ln K'_{eq}$ (Equação 6-3).

TABELA 6-5 Alguns aumentos de velocidade proporcionados por enzimas

Ciclofilina	10^5
Anidrase carbônica	10^7
Triose-fosfato-isomerase	10^9
Carboxipeptidase A	10^{11}
Fosfoglico-mutase	10^{12}
Succinil-CoA-transferase	10^{13}
Urease	10^{14}
Orotidina-monofosfato-descarboxilase	10^{17}

entre enzimas e substratos diminuem a energia de ativação, acelerando a reação porque propiciam condições para que ela ocorra por uma via alternativa de baixa energia. Os tipos específicos de rearranjos que ocorrem estão descritos na Seção 6.4.

A segunda parte da explicação fundamenta-se em interações *não covalentes* entre enzima e substrato. Lembre-se, do Capítulo 4, que interações fracas não covalentes ajudam a estabilizar a estrutura das proteínas e interações proteína-proteína. Essas mesmas interações são cruciais para a formação de complexos entre proteínas e moléculas pequenas, incluindo os substratos de enzimas. Muito da energia necessária para diminuir a energia de ativação provém de interações fracas não covalentes entre substrato e enzima. O que realmente diferencia as enzimas de outros catalisadores é a formação de um complexo ES específico. As interações entre substrato e enzima que ocorrem nesses complexos são mediadas pelas mesmas forças que estabilizam a estrutura das proteínas, incluindo ligações de hidrogênio, interações iônicas e efeito hidrofóbico (Capítulo 4). A formação de cada interação fraca no complexo ES é acompanhada pela liberação de uma pequena quantidade de energia livre que estabiliza a interação. A energia derivada da interação enzima-substrato é denominada **energia de ligação**, ΔG_B e tem um significado que vai muito mais além do que uma simples interação enzima-substrato. *A energia de ligação é a principal fonte de energia livre utilizada pelas enzimas para a diminuição da energia de ativação das reações.*

Dois princípios fundamentais inter-relacionados possibilitam uma explicação geral de como as enzimas utilizam a energia de ligação não covalente:

1. Muito do poder catalítico das enzimas provém basicamente da energia livre liberada na formação de muitas ligações fracas e interações entre a enzima e o substrato. Essa energia de ligação contribui tanto para a especificidade como para a catálise.
2. As interações fracas são otimizadas no estado de transição da reação. Os sítios ativos das enzimas são complementares não aos substratos em si, mas aos estados de transição pelos quais os substratos passam ao serem convertidos em produtos durante a reação enzimática.

Esses termos são essenciais para o entendimento das enzimas e constituem um importante foco deste capítulo.

As interações fracas entre enzima e substrato são otimizadas no estado de transição

Como as enzimas utilizam a energia de ligação para diminuir a energia de ativação de uma reação? A formação do complexo ES não é, por si só, uma explicação, embora algumas das primeiras considerações sobre os mecanismos de ação das enzimas tenham começado com essa ideia. Estudos sobre a especificidade das enzimas, realizados por Emil Fischer, levaram-no a propor, em 1894, que as enzimas seriam estruturalmente complementares aos seus respectivos substratos, de modo a se encaixarem como uma chave se encaixa em uma fechadura (**Figura 6-4**). Essa ideia elegante de que uma interação específica (portanto, exclusiva) entre duas moléculas biológicas seria mediada por superfícies moleculares com formas complementares influenciou muito o desenvolvimento da bioquímica. Efetivamente, essas interações são centrais para muitos processos bioquímicos. Entretanto, a hipótese da “chave e fechadura” pode ser enganadora quando aplicada à catálise enzimática. Uma enzima totalmente complementar ao substrato seria uma enzima muito pobre, como se pode demonstrar.

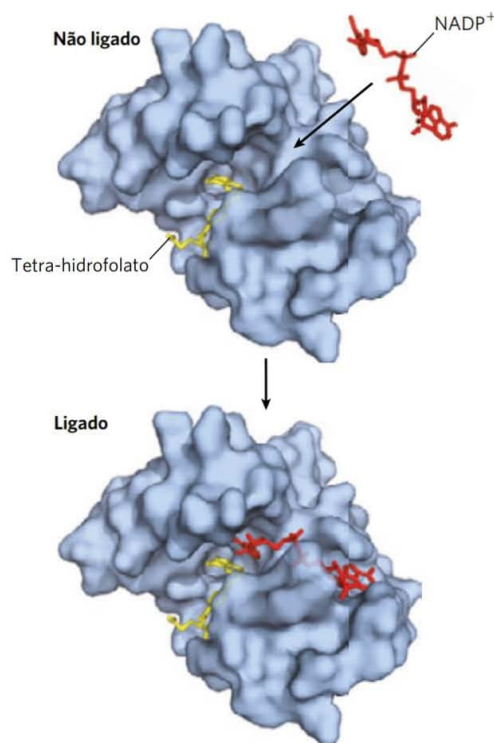


FIGURA 6-4 Complementaridade de formas entre o substrato e o seu sítio de ligação na enzima. A enzima di-hidrofolato-redutase com o seu substrato NADP^+ , não ligado e ligado; também está visível outro substrato, tetra-hidrofolato. Neste modelo, o NADP^+ liga-se a um bolsão complementar à sua forma e às suas propriedades iônicas, ilustração da hipótese de “chave e fechadura” proposta por Emil Fischer para a ação enzimática. Na realidade, a complementaridade entre proteína e ligante (neste caso, o substrato) raramente é perfeita, como discutido no Capítulo 5. [Fonte: PDB ID 1RA2, M. R. Sawaya e J. Kraut, *Biochemistry* 36:586, 1997.]

Por exemplo, considere uma reação imaginária, a quebra de um bastão de metal magnetizado; a reação não catalisada está mostrada na **Figura 6-5a**. Examinaremos duas enzimas imaginárias – duas “bastonases” – que poderiam catalisar essa reação. Ambas utilizam forças magnéticas como paradigma para a energia de ligação utilizada por enzimas reais. Primeiro, está mostrado o esboço de uma enzima perfeitamente complementar ao substrato (**Figura 6-5b**). O sítio ativo dessa bastonase é um bolsão delimitado por ímãs. Para reagir (quebrar), o bastão deve atingir o estado de transição da reação, mas o bastão se encaixa tão perfeitamente ao sítio ativo que não consegue se dobrar, pois ao se dobrar haveria a eliminação de algumas das interações magnéticas entre o bastão e a enzima. Uma enzima desse tipo *impede* a reação, uma vez que estabiliza o substrato, em vez de desestabilizá-lo. No diagrama de coordenadas da reação (**Figura 6-5b**), esse tipo de complexo ES correspon-

deria a uma energia da qual o substrato teria dificuldade de escapar. Uma enzima dessas não teria utilidade.

A noção moderna da catálise enzimática, primeiramente proposta por Michael Polanyi (1921) e Haldane (1930), foi elaborada por Linus Pauling, em 1946, e por William P. Jencks, na década de 1970. Para poder catalisar reações, as enzimas devem ser complementares ao *estado de transição da reação*. Isso significa que interações ótimas entre substratos e enzimas só ocorrem no estado de transição. A **Figura 6-5c** mostra como uma enzima dessas pode funcionar. O bastão de metal liga-se à bastonase, mas apenas um subconjunto das interações magnéticas possíveis é usado para formar o complexo ES. O substrato ligado ainda deve ter aumento na energia livre para atingir o estado de transição. Agora, entretanto, o aumento na energia livre necessário para fazer o bastão curvar e quebrar parcialmente a sua conformação é compensado, ou “pago”, pelas inte-

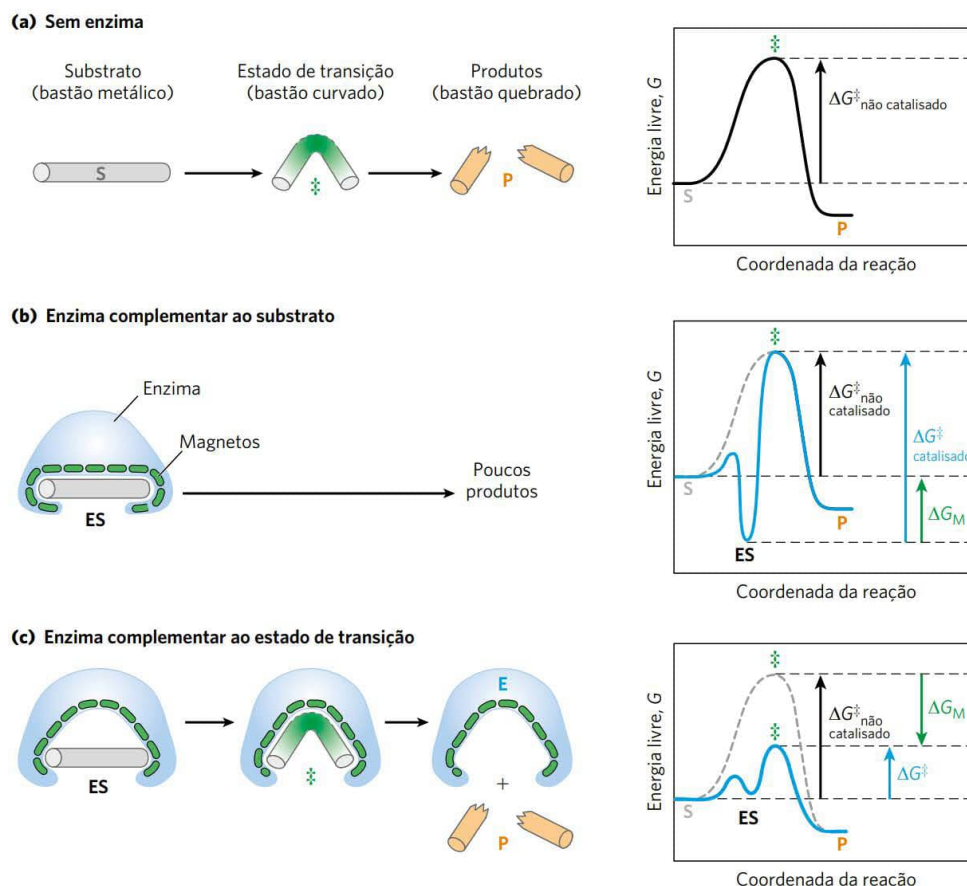


FIGURA 6-5 Proposta de uma enzima imaginária (bastonase) que catalisa a quebra de um bastão metálico. (a) Antes da quebra, o bastão primeiro deve ser curvado (o estado de transição). Nos dois exemplos de bastonase, interações magnéticas representam as ligações fracas entre a enzima e o substrato. (b) A bastonase com um bolsão magnético de estrutura complementar à do bastão (o substrato) estabiliza o substrato. O curvamento é impedido pelas atrações magnéticas entre o bastão e a bastonase. (c) Uma enzima com bolsão complementar ao estado de transição da reação ajuda a desestabilizar o bastão, contribuindo para a catálise da reação. A energia de ligação das interações magnéticas compensa o aumento da energia livre necessária para curvar o bastão. Os diagramas das coordenadas das reações (à direita) mostram as consequências energéticas da complementaridade ao substrato *versus* a complementaridade ao estado de transição (os complexos EP estão omitidos). ΔG_M , a diferença entre as energias dos estados de transição da reação catalisada e da não catalisada, reflete a contribuição das interações magnéticas entre o bastão e a bastonase. Quando a enzima for complementar ao substrato (b), o complexo ES é mais estável e tem menos energia livre no estado basal que o substrato isoladamente. O resultado é um aumento na energia de ativação.

rações magnéticas formadas entre essa enzima imaginária e o estado de transição do substrato (em analogia à energia de ligação de uma enzima real). Muitas dessas interações envolvem partes do bastão distantes do ponto de quebra. Assim, as interações entre a bastonase e as regiões não reagentes do bastão fornecem parte da energia necessária para catalisar a quebra do bastão. Esse “pagamento de energia” se traduz em diminuição efetiva na energia de ativação e aumento na velocidade da reação.

As enzimas reais agem segundo um princípio análogo. No complexo ES há a formação de interações fracas, mas uma complementaridade total entre o substrato e a enzima ocorre apenas quando o substrato estiver no estado de transição. A energia livre (energia de ligação) liberada durante a formação dessas interações compensa parcialmente a energia necessária para atingir o topo da curva de energia. A soma de uma energia de ativação desfavorável ΔG^\ddagger (positiva) e de uma energia de ligação favorável ΔG_B (negativa) resulta em uma energia de ativação líquida menor (**Figura 6-6**). Mesmo quando ligado à enzima, o estado de transição não é uma forma estável, mas sim o breve instante de tempo em que o substrato permanece no topo da curva de energia. Reações catalisadas por enzimas são muito mais rápidas que os processos não catalisados, pois a barreira energética a ser vencida é muito menor. O princípio importante é que *interações por meio de ligações fracas entre a enzima e o substrato fornecem uma substancial força propulsora para a catálise enzimática*. Os grupos presentes no substrato e envolvidos nessas ligações fracas podem atuar a alguma distância das ligações rompidas ou modificadas. As interações fracas formadas apenas no estado de transição são aquelas que dão a principal contribuição para a catálise.

A necessidade de múltiplas interações fracas para impedir a catálise ajuda a explicar por que as enzimas (e algumas coenzimas) são tão grandes. A enzima deve fornecer grupos funcionais para as interações iônicas, ligações de hidrogênio e outras interações importantes e também deve posicionar precisamente esses grupos, de modo que a energia de ligação seja otimizada no estado de transição. A formação de uma ligação adequada é atingida mais facilmente pelo

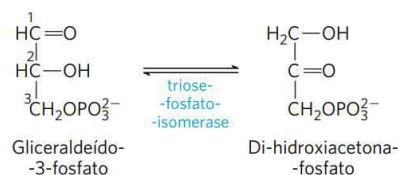
posicionamento do substrato em uma cavidade (o sítio ativo) onde é efetivamente removido da água. O tamanho das proteínas reflete a necessidade de uma superestrutura para manter os grupos interativos posicionados adequadamente e também para evitar o colapso da cavidade.

A energia de ligação contribui para a especificidade da reação e a catálise

É possível demonstrar quantitativamente que a energia de ligação é responsável pela enorme aceleração na velocidade proporcionada pelas enzimas? A resposta é sim. Como ponto de referência, a Equação 6-6 permite calcular que, nas condições normais das células, ΔG^\ddagger deve ser diminuído em cerca de 5,7 kJ/mol para acelerar uma reação de primeira ordem por um fator de 10. A energia que é disponibilizada pela formação de uma única interação fraca geralmente é estimada em 4 a 30 kJ/mol. A energia total disponibilizada por certo número dessas interações é, portanto, suficiente para diminuir a energia de ativação entre os 60 e os 100 kJ/mol necessários para explicar o grande aumento na velocidade das reações observado em muitas enzimas.

A mesma energia de ligação que fornece energia para a catálise também dá às enzimas sua **especificidade**, isto é, a capacidade de distinguir entre substratos e moléculas competidoras. Conceitualmente, especificidade é fácil de distinguir de catálise, contudo, essa diferenciação é muito mais difícil de demonstrar experimentalmente, pois a catálise e a especificidade provêm do mesmo fenômeno. Se o sítio ativo de uma enzima tiver grupos funcionais organizados otimamente, de modo que se forme uma grande variedade de interações fracas com determinado substrato no correspondente estado de transição, a enzima não será capaz de interagir com a mesma intensidade com outra molécula. Por exemplo, se o substrato tiver um grupo hidroxila que forme uma ligação de hidrogênio com um resíduo específico de Glu de uma enzima, qualquer molécula que não tiver um grupo hidroxila naquela determinada posição será um mau substrato para a enzima. Além disso, qualquer molécula que tiver um grupo funcional extra para o qual a enzima não possua um bolsão ou um sítio de ligação provavelmente será excluída da enzima. De maneira geral, a *especificidade* provém da formação de muitas interações fracas entre a enzima e a molécula do substrato.

A importância da energia de ligação para a catálise pode ser demonstrada facilmente. Por exemplo, a enzima glicolítica triose-fosfato-isomerase catalisa a interconversão entre gliceraldeído-3-fosfato e di-hidroxiacetona-fosfato:



Essa reação rearranja os grupos carbonila e hidroxila dos carbonos 1 e 2. Entretanto, mais de 80% da aceleração da velocidade da reação catalisada pela enzima foi relacionado com as interações enzima-substrato envolvendo o gru-

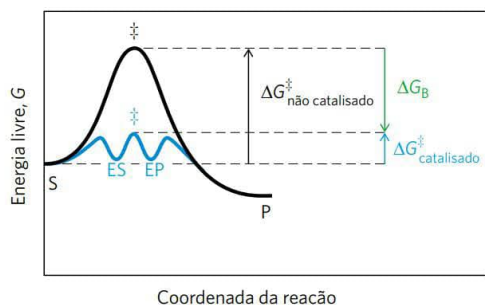


FIGURA 6-6 Papel da energia de ligação na catálise. Para diminuir a energia de ativação da reação, o sistema deve adquirir uma quantidade de energia equivalente ao valor da diminuição de ΔG^\ddagger . Boa parte dessa energia vem da energia de ligação, ΔG_B , proporcionada pela formação de interações fracas não covalentes entre substrato e enzima que ocorrem no estado de transição. O papel de ΔG_B é análogo ao de ΔG_M na Figura 6-5.

po fosfato do carbono 3 do substrato. Isso foi determinado comparando as reações catalisadas pela enzima usando como substratos gliceraldeído-3-fosfato e gliceraldeído (sem grupo fosfato na posição 3).

O princípio geral apresentado anteriormente pode ser ilustrado por vários mecanismos catalíticos bem conhecidos. Esses mecanismos não se excluem mutuamente, de modo que uma mesma enzima pode ter vários tipos de mecanismos participando do mecanismo total de ação.

Há necessidade de vários fatores para que uma reação ocorra. Os principais fatores físicos e termodinâmicos que contribuem para ΔG^\ddagger , a barreira da reação, podem incluir (1) a entropia (liberdade de movimento) das moléculas em solução, que reduz a possibilidade de que elas reajam entre si; (2) a camada de solvatação das moléculas de água ligadas por ligações de hidrogênio e que rodeiam e ajudam a estabilizar a maioria das moléculas biológicas em solução aquosa; (3) a distorção dos substratos que ocorre em muitas reações; e (4) a necessidade de um alinhamento apropriado dos grupos funcionais catalíticos da enzima. A energia de ligação pode ser usada para superar todas essas barreiras.

Primeiro, uma grande restrição à mobilidade relativa de dois substratos prestes a reagir, ou **redução da entropia**, é uma contribuição óbvia proporcionada pela ligação deles à enzima. A energia de ligação mantém o substrato na orientação apropriada para reagir, uma contribuição substancial para a catálise, uma vez que colisões produtivas entre as moléculas da solução podem ser muito raras. Os substratos podem ser alinhados precisamente com a enzima com muitas interações fracas entre cada substrato e grupos estrategicamente posicionados na enzima, fixando as moléculas de substrato na posição apropriada. Estudos mostraram que restrições à mobilidade de dois reagentes podem produzir um aumento de várias ordens de grandeza na velocidade (Figura 6-7).

Segundo, a formação de ligações fracas entre substrato e enzima resulta na **dessolvatação** do substrato. Interações enzima-substrato substituem a maioria das ligações de hidrogênio entre o substrato e as moléculas de água que são um impedimento para a reação.

Terceiro, a energia de ligação envolvendo interações fracas formadas apenas na reação do estado de transição ajuda a compensar termodinamicamente uma variação de energia livre desfavorável associada com a distorção, redistribuição primária de elétrons, que o substrato deve sofrer para que a reação ocorra.

Finalmente, em geral a enzima também sofre uma mudança de conformação quando o substrato se liga a ela, induzindo várias interações fracas com o substrato. Isso é chamado de **ajuste induzido**, mecanismo postulado por Daniel Koshland em 1958. Esses movimentos podem afetar apenas uma pequena parte da enzima nas proximidades do sítio ativo ou podem envolver mudanças no posicionamento de domínios inteiros da enzima. Normalmente, uma rede de movimentos acoplados ocorre por toda a enzima, que finalmente leva às mudanças necessárias no sítio ativo. O ajuste induzido serve para levar grupos funcionais específicos da enzima para uma posição apropriada para catalisar a reação. As mudanças conformacionais também permitem a formação de ligações fracas adicionais no estado de transição. Em

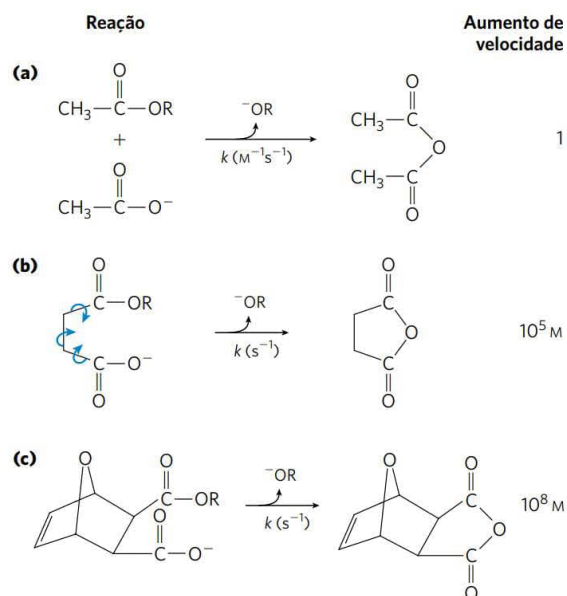


FIGURA 6-7 Aumento da velocidade por redução da entropia.

A figura mostra reações de ésteres com grupos carboxilatos, formando anidridos. Em todos os casos, o grupo R é o mesmo. (a) No caso desta reação bimolecular, a constante de velocidade k é de segunda ordem e tem $M^{-1}s^{-1}$ como unidade. (b) Quando os dois grupos reagentes estão em uma mesma molécula e, conseqüentemente, têm menor liberdade de movimento, a reação é muito mais rápida. No caso desta reação unimolecular, k tem s^{-1} como unidade. Dividindo a constante de velocidade de (b) pela constante de velocidade de (a) obtém-se um fator de aumento de velocidade de $10^5 M$. (O aumento de velocidade tem como unidade a molaridade, pois, neste caso, uma reação unimolecular foi comparada com uma reação bimolecular.) Vendo de outra maneira, se o reagente em (b) estiver presente na concentração de $1 M$, os grupos reagentes irão se comportar como se eles estivessem presentes na concentração de $10^5 M$. Observe que o reagente em (b) tem uma liberdade de rotação ao redor de três ligações (mostradas com flechas curvas) e ainda representa uma redução substancial na entropia em relação à (a). Se as rotações das ligações que giram em (b) forem tolhidas como em (c), a entropia é reduzida ainda mais, e a reação apresenta um aumento de velocidade de $10^8 M$ em relação à (a).

ambos os casos, na nova conformação as propriedades catalíticas da enzima ficam aumentadas. Como foi visto, o ajuste induzido é uma característica comum da interação reversível de ligantes com proteínas (Capítulo 5). O ajuste induzido também é importante para a interação de praticamente todas as enzimas com os seus substratos.

Grupos catalíticos específicos contribuem para a catálise

Em muitas enzimas, a energia de ligação utilizada para formar o complexo ES é apenas um dos vários fatores que contribuem para o mecanismo total de catálise. Uma vez que o substrato esteja ligado à enzima, grupos funcionais catalíticos posicionados de modo apropriado ajudam no rompimento e na formação de ligações por vários mecanismos, incluindo catálise geral acidobásica, catálise covalente e catálise por íons metálicos. Esses mecanismos são diferentes dos mecanismos com base na energia de ligação, pois geralmente envolvem uma interação transitória *covalente* com

o substrato ou a transferência de um grupo do substrato ou para o substrato.

Catálise geral acidobásica A transferência de prótons é a reação mais comum na bioquímica. No curso da maioria das reações que ocorrem nas células há transferência de um ou, geralmente, de muitos prótons. Muitas reações bioquímicas ocorrem por meio da formação de intermediários carregados instáveis que tendem a se degradar rapidamente, formando as espécies reagentes e impedindo, assim, a reação reversa (**Figura 6-8**). Intermediários carregados geralmente podem ser estabilizados pela transferência de prótons e formar espécies que prontamente formam os produtos. Esses prótons são transferidos entre a enzima e o substrato ou o intermediário.

Os efeitos da catálise por ácidos e bases geralmente são estudados usando modelos de reação não enzimáticos, nos quais os doadores ou aceptores de prótons são os constituintes da água ou de outros ácidos e bases fortes. A catálise do tipo que usa apenas H^+ (H_3O^+) ou íons OH^- presentes na água é denominada **catálise acidobásica**

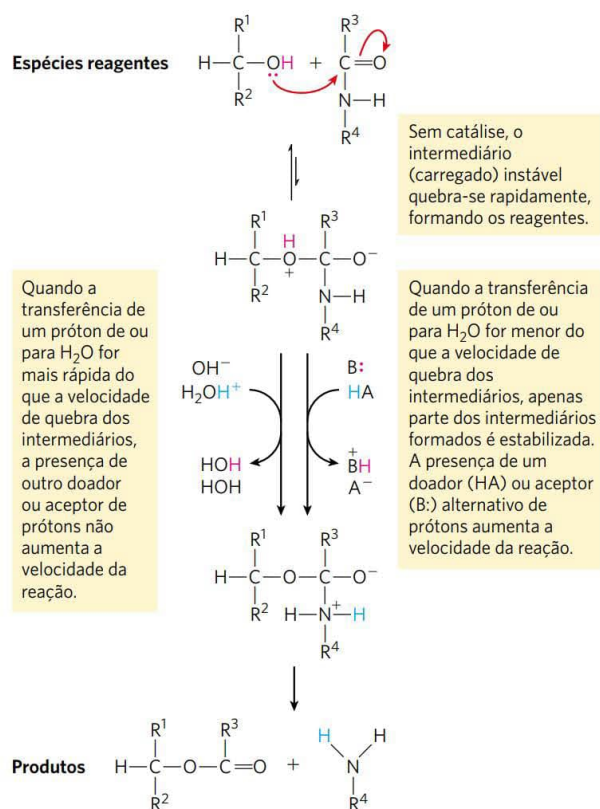
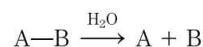


FIGURA 6-8 Como o catalisador contorna o incremento de cargas desfavoráveis durante a hidrólise de uma amida. A hidrólise da ligação amida, mostrada aqui, é a mesma reação que a quimotripsina e outras proteases catalisam. O incremento de cargas é desfavorável e pode ser contornado pela doação de um próton por parte de H_3O^+ (catálise ácida específica) ou HA (catálise ácida geral), sendo que HA representa qualquer ácido. De maneira semelhante, a carga pode ser neutralizada pela abstração de um próton por OH^- (catálise ácida específica) ou B: (catálise básica geral), na qual B: representa uma base qualquer.

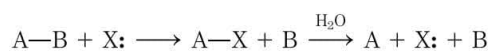
específica. Se a transferência de prótons entre o intermediário e a água for mais rápida do que a quebra do intermediário em reagentes, o intermediário é estabilizado cada vez que se formar e não haverá nenhuma catálise adicional mediada por outros aceptores ou doadores de prótons. Em muitas reações, porém, a água não evita a quebra em reagentes. Nesses casos, para reações não enzimáticas em soluções aquosas, pode-se adicionar ácidos e bases fracos para acelerar a velocidade de reação. Nessa situação, muitos ácidos orgânicos fracos podem complementar a ação da água como doadores de prótons, ou bases orgânicas fracas podem complementar a ação da água como aceptores de prótons. O termo **catálise geral acidobásica** refere-se à transferência de prótons mediada por alguma outra molécula que não água.

A catálise acidobásica é crucial para o sítio ativo de enzimas, onde não há água disponível para servir como doador ou aceptor de prótons. As cadeias laterais de vários aminoácidos podem ter papel como doadoras ou aceptoras de prótons (**Figura 6-9**). Esses grupos podem estar posicionados precisamente no sítio ativo da enzima, de modo a possibilitar a transferência de prótons, proporcionando um aumento de velocidade da ordem de 10^2 a 10^5 . Esse tipo de catálise ocorre na grande maioria das enzimas.

Catálise covalente Na **catálise covalente** há a formação de uma ligação covalente transitória entre a enzima e o substrato. Considere a hidrólise de uma ligação entre os grupos A e B:



Na presença de um catalisador covalente (enzima com grupo nucleofílico X:), a reação torna-se



Resíduo de aminoácido	Forma geral ácida (doador de próton)	Forma geral básica (aceptor de próton)
Glu, Asp	$R-COOH$	$R-COO^-$
Lys, Arg	$R-\overset{+}{N}H_2$	$R-NH_2$
Cys	$R-SH$	$R-S^-$
His	$R-C(=NH^+)-N$	$R-C(=N)-N$
Ser	$R-OH$	$R-O^-$
Tyr	$R-C_6H_4-OH$	$R-C_6H_4-O^-$

FIGURA 6-9 Aminoácidos na catálise geral acidobásica. Muitas reações orgânicas são favorecidas por doadores (ácidos gerais) ou aceptores (bases gerais) de prótons. Os sítios ativos de algumas enzimas têm grupos funcionais de aminoácidos, como os mostrados aqui, que podem participar dos processos catalíticos como doadores ou aceptores de prótons.

A formação e a quebra de um intermediário covalente cria um novo caminho para a reação, mas ocorre *catálise somente* quando o novo caminho tiver uma energia de ativação menor do que a energia de ativação da reação não catalisada. As duas novas etapas, formação e quebra do intermediário, devem ser mais rápidas do que a reação não catalisada. Cadeias laterais de muitos aminoácidos, incluindo as mostradas na Figura 6-9, e grupos funcionais de alguns cofatores de enzimas servem como agentes nucleofílicos na formação de ligações covalentes com substratos. Esses complexos covalentes sempre passam por uma reação adicional para regenerar a enzima livre. A ligação covalente entre enzima e substrato pode ativar o substrato para uma reação seguinte de modo geralmente específico para um grupo ou uma coenzima.

Catálise por íons metálicos Metais, tanto ligados firmemente a enzimas quanto tomados da solução juntamente com o substrato, podem participar na catálise de várias maneiras. Interações iônicas entre metais ligados a enzimas e substratos podem ajudar a orientar o substrato para a reação ou estabilizar estados de transição carregados. Esse tipo de uso de interações fracas entre metais e substratos é similar a alguns dos usos da energia de ligação enzima-substrato descritos anteriormente. Os metais também podem ser mediadores de reações de oxidorredução por mudanças reversíveis no estado de oxidação do íon metálico. Aproximadamente um terço de todas as enzimas conhecidas necessita de um ou mais íons metálicos para a atividade catalítica.

A maioria das enzimas combina várias estratégias de catálise para proporcionar um aumento na velocidade das reações. Um bom exemplo é o uso de catálise covalente, catálise geral acidobásica e estabilização do estado de transição na reação catalisada pela quimotripsina, apresentada em detalhes na Seção 6.4.

RESUMO 6.2 Como as enzimas funcionam

- As enzimas são catalisadores altamente eficazes, geralmente aumentando as velocidades de reação por um fator de 10^5 a 10^{17} .
- As reações catalisadas por enzimas são caracterizadas pela formação de um complexo entre o substrato e a enzima (complexo ES). A ligação ao substrato ocorre em um bolsão da enzima, denominado sítio ativo.
- A função das enzimas e dos outros catalisadores é diminuir a energia de ativação, ΔG^\ddagger , da reação e, assim, aumentar a velocidade da reação. O equilíbrio da reação não é afetado pela enzima.
- Uma porção significativa da energia usada no aumento da velocidade da reação proporcionada pela enzima provém de interações fracas (ligações de hidrogênio, agregação devido ao efeito hidrofóbico e interações iônicas) entre o substrato e a enzima. O sítio ativo das enzimas é estruturado de modo que algumas dessas ligações fracas ocorrem preferencialmente no estado de transição, estabilizando esse estado.
- A necessidade de interações múltiplas é uma das razões para o grande tamanho das enzimas. A energia de liga-

ção, ΔG_B , é usada para contrabalançar a energia necessária para a ativação, ΔG^\ddagger , de várias maneiras, como, por exemplo, diminuindo a entropia, provocando a dessolvatação do substrato ou provocando uma mudança conformacional na enzima (ajuste induzido). A energia de ligação também é responsável pela extraordinária especificidade das enzimas por seus substratos.

- Mecanismos catalíticos adicionais utilizados pelas enzimas incluem a catálise geral acidobásica, a catálise covalente e a catálise por íons metálicos. A catálise geral envolve interações covalentes transitórias entre o substrato e a enzima, ou a transferência de um grupo químico da enzima ou para a enzima, de modo a proporcionar um caminho novo e com menor energia de ativação para a reação. Em qualquer dos casos, as enzimas retornam ao estado não ligado uma vez que a reação tenha se completado.

6.3 A cinética enzimática como abordagem para compreender mecanismos

Normalmente, os bioquímicos utilizam várias abordagens para estudar o mecanismo de ação de enzimas purificadas. A estrutura tridimensional das proteínas fornece informações importantes, que são incrementadas pela química de proteínas e por modernos métodos de mutagênese sítio-dirigida (mudança na sequência de aminoácidos de uma proteína por engenharia genética; ver Figura 9-10). Essas tecnologias permitem que os enzimologistas examinem o papel de aminoácidos individualmente na estrutura e na atividade de uma enzima. Entretanto, a abordagem mais antiga para entender o mecanismo das enzimas, e que ainda continua como uma das mais importantes, é determinar a *velocidade* da reação e como ela muda em resposta a alterações nos parâmetros experimentais, disciplina conhecida como **cinética enzimática**. A seguir, será apresentada uma breve introdução à cinética das reações catalisadas por enzimas.

A concentração do substrato influi na velocidade das reações catalisadas por enzimas

Um fator-chave que afeta a velocidade das reações catalisadas por enzimas é a concentração do substrato, $[S]$. Entretanto, o estudo dos efeitos da concentração do substrato é complicado devido ao fato de $[S]$ se modificar durante o curso de uma reação *in vitro* à medida que o substrato é convertido em produto. Uma abordagem que simplifica os experimentos de cinética enzimática é medir a **velocidade inicial**, designada como V_0 (Figura 6-10). Em uma reação típica, a enzima pode estar presente em quantidades nanomolares, ao passo que $[S]$ pode estar em uma ordem de magnitude cinco ou seis vezes maior. Se apenas o início da reação for monitorado, durante um período no qual apenas uma pequena porcentagem do substrato disponível é convertida em produto, $[S]$ pode ser considerada como permanecendo constante com um grau razoável de aproximação. V_0 pode ser explorado em função de $[S]$, que é ajustada pelo pesquisador. O efeito da variação de $[S]$ sobre V_0 quando a

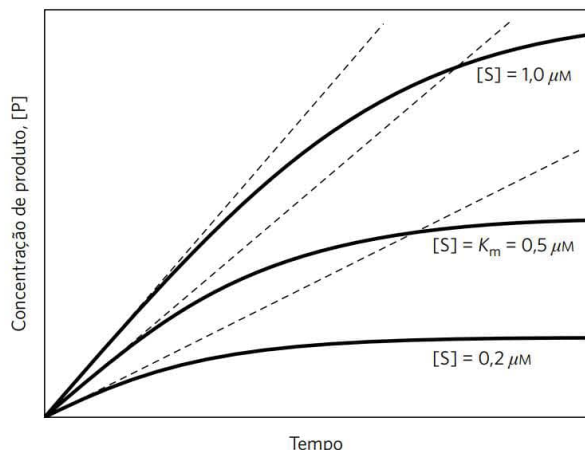


FIGURA 6-10 Velocidades iniciais de reações catalisadas por enzimas. Uma enzima teórica que catalise uma reação está presente em concentração suficiente para catalisar a reação à velocidade máxima, $V_{\text{máx}}$, de $1 \mu\text{M}/\text{min}$. A constante de Michaelis, K_m (explicada no texto), é $0,5 \mu\text{M}$. Estão mostradas as curvas de progressão da reação para concentrações abaixo da K_m , exatamente na K_m e acima dela. A velocidade de uma reação catalisada por uma enzima diminui à medida que o substrato é convertido em produto. A tangente de cada curva no tempo = 0 define a velocidade inicial, V_0 , de cada uma das reações.

concentração da enzima é mantida constante está mostrado na **Figura 6-11**. Em concentrações relativamente baixas de substrato, V_0 aumenta quase linearmente com o aumento de $[S]$. Em altas concentrações de substrato, V_0 aumenta muito pouco em resposta a um aumento na $[S]$. Por fim, é atingido um ponto além do qual o aumento de $[S]$ leva a um aumento

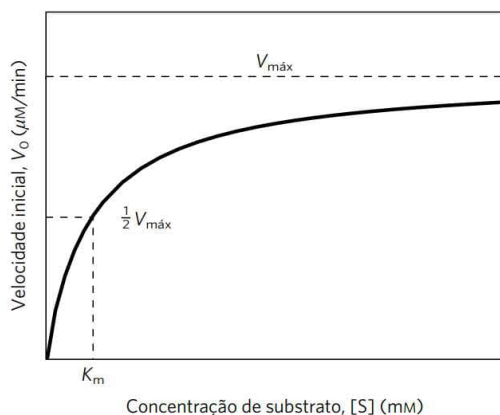


FIGURA 6-11 Efeito da concentração do substrato sobre a velocidade inicial de uma reação catalisada por enzima. A velocidade máxima, $V_{\text{máx}}$, pode ser extrapolada do gráfico porque V_0 se aproxima, mas nunca chega a $V_{\text{máx}}$. A concentração do substrato na qual V_0 é metade da velocidade máxima é K_m , a constante de Michaelis. A concentração da enzima em experimentos como este geralmente é tão baixa que $[S] \gg [E]$, mesmo quando $[S]$ é descrita como baixa ou relativamente baixa. As unidades usadas neste gráfico são as unidades típicas para reações não catalisadas e apenas ajudam a ilustrar o significado de V_0 e $[S]$. (Observe que a curva descreve *parte* de uma hipérbole retangular, com assíntota em $V_{\text{máx}}$. Caso a curva continuasse até abaixo de $[S] = 0$, ela se aproximaria de uma assíntota vertical em $[S] = -K_m$.)

insignificante na V_0 . Essa região de V_0 tipo platô está próxima à **velocidade máxima, $V_{\text{máx}}$** .

O complexo ES é a chave para entender este comportamento catalítico, e por isso foi o ponto inicial desta discussão sobre catálise. Os parâmetros cinéticos da Figura 6-11 levaram Victor Henri, sob a liderança de Wurtz, a propor, em 1903, que a combinação da enzima com a molécula do substrato é uma etapa necessária da catálise. Essa ideia foi ampliada em uma teoria geral de ação de enzimas, principalmente por Leonor Michaelis e Maud Menten, em 1913. Os dois postularam que a enzima primeiramente se combina de modo reversível com o substrato, formando um complexo enzima-substrato em uma etapa reversível e relativamente rápida:



Então, o complexo ES é rompido em uma segunda etapa mais lenta, fornecendo a enzima livre e o produto P:



Uma vez que a segunda reação é mais lenta (Equação 6-8), ela limita a velocidade da reação total. A velocidade total deve ser proporcional à concentração das espécies que reagem na segunda etapa, isto é, ES.



Leonor Michaelis, 1875-1949
[Fonte: Rockefeller Archive Center.]



Maud Menten, 1879-1960
[Fonte: cortesia de Archives Service Center, University of Pittsburgh.]

Em determinado instante de uma reação catalisada por enzima, a enzima existe em duas formas, na forma livre ou não combinada (E) e na forma combinada (ES). Em baixa $[S]$, a maior parte da enzima está na forma não combinada E. Assim, a velocidade é proporcional a $[S]$ porque o equilíbrio da Equação 6-7 é deslocado na direção da formação de mais ES à medida que $[S]$ aumenta. A velocidade inicial máxima de uma reação catalisada ($V_{\text{máx}}$) ocorre quando quase toda a enzima estiver presente como complexo ES e $[E]$ for muitíssimo baixa. Nessas condições, a enzima está “saturada” com o substrato, e então um incremento na $[S]$ não produz efeito na velocidade. Essa condição ocorre quando $[S]$ for alta o suficiente para que essencialmente toda a enzima livre seja convertida na forma ES. Após o rompimento do complexo ES, formando o produto (P), a enzima fica livre

para catalisar a reação de mais uma molécula do substrato (e sob condições saturantes segue fazendo isso rapidamente). A saturação pelo substrato é uma propriedade característica da catálise enzimática e é responsável pelo platô observado na Figura 6-11. Muitas vezes, o padrão observado na figura é denominado cinética de saturação.

Logo que a enzima é misturada com um grande excesso de substrato, há um período inicial, o **estado pré-estacionário**, durante o qual a concentração de ES aumenta. No caso da maioria das reações enzimáticas, esse período é muito breve. Em geral, ele é tão pequeno que não pode ser observado com facilidade, durando apenas microssegundos, de modo que ele não fica evidente na Figura 6-10. (A discussão sobre o estado pré-estacionário será retomada mais adiante.) A reação rapidamente atinge o **estado estacionário**, no qual [ES] (e as concentrações de qualquer outro intermediário) permanece constante ao longo do tempo. O conceito de estado estacionário, introduzido por G. E. Briggs e Haldane em 1925, é uma aproximação baseada em um fato simples. Como ressaltado anteriormente, as enzimas são catalisadores poderosos que, normalmente, estão presentes em várias ordens de grandeza de concentrações menores do que a concentração do substrato. Assim que a fase transitente de estado estacionário passa (geralmente depois de apenas um ciclo de catálise; isto é, a conversão de uma molécula de substrato em uma molécula de produto por cada molécula de enzima), a geração do produto P passa a ter a mesma velocidade na qual [S] é consumido apenas se a concentração de ES permanecer estacionária. A determinação de V_0 geralmente reflete o estado estacionário. Ainda que V_0 esteja limitada à parte inicial da reação, a análise da velocidade inicial é denominada **cinética do estado estacionário**.

A relação entre a concentração do substrato e a velocidade da reação pode ser expressa quantitativamente

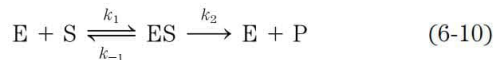
A curva que expressa a relação entre [S] e V_0 (Figura 6-11) tem a mesma forma geral para a maioria das enzimas (aproximadamente uma hipérbole retangular) e pode ser expressa algebricamente pela equação de Michaelis-Menten. Michaelis e Menten deduziram essa equação a partir da hipótese, formulada por eles, de que a etapa limitante da velocidade em uma reação enzimática é a quebra do complexo ES em produto e enzima livre. A equação é

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (6-9)$$

Todos os termos — [S], V_0 , V_{\max} e a constante K_m , denominada constante de Michaelis — podem ser medidos experimentalmente.

Agora, serão examinadas as bases lógicas das etapas algébricas de uma dedução moderna da equação de Michaelis-Menten, que inclui a hipótese do estado estacionário introduzida por Briggs e Haldane. A dedução começa com as etapas básicas de formação e quebra de ES (Equações 6-7 e 6-8). No início da reação, a concentração do produto, [P], é desprezível e permite simplificar, considerando-se que a reação inversa, $P \rightarrow S$ (descrita como k_{-2}),

pode ser ignorada. Essa suposição não é fundamental, mas simplifica a dedução. A reação total, então, reduz-se a



V_0 é determinada pela quebra de ES, formando o produto, que é determinado por [ES]:

$$V_0 = k_2 [ES] \quad (6-11)$$

Uma vez que [ES], da Equação 6-11, não pode ser determinada facilmente, deve-se iniciar encontrando uma expressão alternativa para este termo. Primeiro será introduzido o termo $[E_t]$, representando a concentração total da enzima (a soma da enzima livre e da enzima com substrato ligado). A enzima livre, ou não ligada, pode ser representada por $[E_t] - [ES]$. Também, como [S] normalmente é muito maior que $[E_t]$, a quantidade de substrato ligado à enzima em um dado tempo é desprezível em comparação com a quantidade total de substrato, [S]. Tendo essas condições em mente, as próximas etapas levam a uma expressão para V_0 em termos de parâmetros facilmente mensuráveis.

Etapa 1 As velocidades de formação e de quebra de ES são determinadas por etapas governadas pelas constantes de velocidades k_1 (formação) e $k_{-1} + k_2$ (quebra formando os reagentes e os produtos, respectivamente), segundo a expressão

$$\text{Velocidade da formação de ES} = k_1 ([E_t] - [ES])[S] \quad (6-12)$$

$$\text{Velocidade da quebra de ES} = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \quad (6-13)$$

Etapa 2 Deve-se, agora, fazer uma suposição importante: a velocidade inicial da reação reflete o estado estacionário, no qual [ES] é constante. Isto é, a velocidade da formação de ES é igual à velocidade da quebra de ES. Isso é chamado de **suposição do estado estacionário**. As expressões das Equações 6-12 e 6-13 são igualadas no estado estacionário, resultando em

$$k_1([E_t] - [ES])[S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \quad (6-14)$$

Etapa 3 Em uma série de etapas algébricas, pode-se resolver a Equação 6-14 para [ES]. Primeiro, o lado esquerdo da equação é multiplicado, e o lado direito, simplificado:

$$k_1[E_t][S] - k_1[ES][S] = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (6-15)$$

Adicionando o termo $k_1[ES][S]$ aos dois lados da equação e simplificando, tem-se

$$k_1[E_t][S] = (k_1[S] + k_{-1} + k_2)[ES] \quad (6-16)$$

Então, a solução dessa equação para [ES] é:

$$[ES] = \frac{k_1[E_t][S]}{k_1[S] + k_{-1} + k_2} \quad (6-17)$$

Agora, isso pode ser ainda mais simplificado, combinando as constantes de velocidade em uma expressão:

$$[ES] = \frac{[E_t][S]}{[S] + (k_{-1} + k_2)/k_1} \quad (6-18)$$

O termo $(k_{-1} + k_2)/k_1$ é definido como **constante de Michaelis, K_m** . Substituindo esse termo na Equação 6-18, a expressão é simplificada para

$$[ES] = \frac{[E_t][S]}{K_m + [S]} \quad (6-19)$$

Etapa 4 Agora, é possível expressar V_0 em termos de $[ES]$. Substituindo o lado direito da Equação 6-19 para $[ES]$ na Equação 6-11 obtém-se

$$V_0 = \frac{k_2[E_t][S]}{K_m + [S]} \quad (6-20)$$

Esta equação pode ser simplificada ainda mais. Uma vez que a velocidade máxima ocorre quando a enzima está saturada (i.e., quando $[ES] = [E_t]$), V_{\max} pode ser definida como $k_2[E_t]$. A substituição dessa equação na Equação 6-20 dá a Equação 6-9:

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

Esta é a **equação de Michaelis-Menten, a equação da velocidade** da reação com um único substrato, catalisada por uma enzima. Ela define a relação quantitativa entre a velocidade inicial, V_0 , a velocidade máxima, V_{\max} , e a concentração inicial de substrato, $[S]$, todas em relação à constante de Michaelis, K_m . Observe que K_m tem unidades de concentração molar. Será que a equação é condizente com as observações experimentais? Sim. Isso pode ser confirmado considerando as situações limitantes, nas quais $[S]$ é muito alta ou muito baixa, como mostrado na **Figura 6-12**.

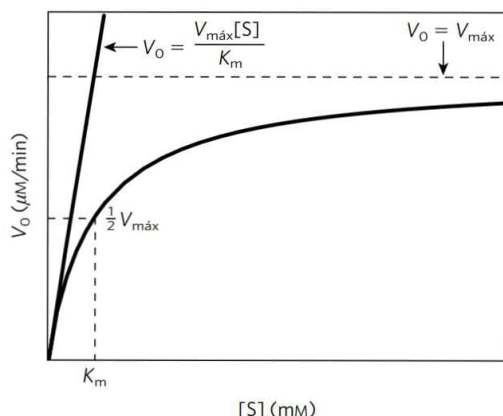


FIGURA 6-12 Dependência da velocidade inicial da concentração de substrato. Este gráfico mostra os parâmetros cinéticos que definem os limites da curva em $[S]$ elevada e baixa. Em baixa $[S]$, $K_m \gg [S]$, e o termo $[S]$ no denominador na equação de Michaelis-Menten (Equação 6-9) torna-se desprezível. A equação é simplificada para $V_0 = V_{\max}[S]/K_m$, e V_0 apresenta uma dependência linear por $[S]$, como observado aqui. Em $[S]$ alta, em que $[S] \gg K_m$, o termo K_m do denominador da equação de Michaelis-Menten passa a ser insignificante e a equação fica simplificada para $V_0 = V_{\max}$. Isso é consistente com o platô observado em alta $[S]$. A equação de Michaelis-Menten é, portanto, consistente com a dependência de V_0 por $[S]$ que é observada, e a forma da curva é definida pelos termos V_{\max}/K_m em $[S]$ baixa e V_{\max} em $[S]$ elevada.

Uma relação numérica importante emerge da equação de Michaelis-Menten no caso especial quando V_0 é exatamente metade da V_{\max} (Figura 6-12). Então

$$\frac{V_{\max}}{2} = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad (6-21)$$

Dividindo-se por V_{\max} , obtém-se

$$\frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad (6-22)$$

Resolvendo para K_m , obtém-se $K_m + [S] = 2[S]$, ou

$$K_m = [S], \quad \text{quando} \quad V_0 = \frac{1}{2}V_{\max} \quad (6-23)$$

Esta é uma definição prática e muito útil de K_m : K_m equivale à concentração do substrato, na qual V_0 é metade da V_{\max} .

A equação de Michaelis-Menten (Equação 6-9) pode ser transformada algebricamente em versões úteis para a determinação prática de K_m e V_{\max} (Quadro 6-1) e, como será descrito posteriormente, na análise da ação de inibidores (ver Quadro 6-2).

Os parâmetros cinéticos são utilizados para comparar a atividade de enzimas

É importante distinguir entre a equação de Michaelis-Menten e o mecanismo cinético específico no qual a equação foi baseada originalmente. A equação descreve o comportamento cinético da grande maioria das enzimas, sendo que todas as enzimas que exibem uma dependência hiperbólica de V_0 sobre $[S]$ são consideradas como enzimas que seguem a **cinética de Michaelis-Menten**. A regra prática de que $K_m = [S]$ quando $V_0 = \frac{1}{2}V_{\max}$ (Equação 6-23) é válida para todas as enzimas que seguem a cinética de Michaelis-Menten. (As enzimas regulatórias são as exceções mais importantes à cinética de Michaelis-Menten, assunto discutido na Seção 6.5.) Contudo, a equação de Michaelis-Menten não depende do mecanismo de reação relativamente simples em duas etapas proposto por Michaelis e Menten (Equação 6-10). Muitas das enzimas que seguem a cinética de Michaelis-Menten têm mecanismos de reação muito diferentes, e mesmo enzimas que catalisam reações com seis ou oito etapas identificáveis geralmente apresentam o mesmo comportamento cinético de estado estacionário. Mesmo que a Equação 6-23 seja verdadeira para muitas enzimas, o significado real tanto de V_{\max} como de K_m pode ser diferente para enzimas diferentes. Essa é uma limitação importante da abordagem do estado estacionário para explicar a cinética enzimática. Os parâmetros V_{\max} e K_m podem ser obtidos experimentalmente para qualquer enzima, mas fornecem pouca informação sobre o número, as velocidades ou a natureza química das etapas da reação. Apesar disso, a cinética do estado estacionário é a linguagem-padrão pela qual os bioquímicos comparam e caracterizam as eficiências catalíticas das enzimas.

Interpretando V_{\max} e K_m A Figura 6-12 mostra um método gráfico simples para obter o valor aproximado de K_m . Um procedimento mais conveniente, usando o **gráfico duplo-recíproco**, está mostrado no Quadro 6-1. A K_m pode variar muito de acordo com a enzima e mesmo para substratos diferentes de uma mesma enzima (Tabela 6-6). Algumas vezes o termo

QUADRO 6-1 Transformações da equação de Michaelis-Menten: o gráfico duplo-recíproco

A equação de Michaelis-Menten

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

pode ser transformada algebricamente em uma equação que é melhor para fazer a curva com os dados experimentais. Uma transformação muito comum é deduzida simplesmente tomando as recíprocas dos dois lados da equação de Michaelis-Menten:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m + [S]}{V_{\max}[S]}$$

Separando os componentes do numerador no lado direito da equação obtém-se

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\max}[S]} + \frac{[S]}{V_{\max}[S]}$$

que é simplificado para

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\max}[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Essa forma da equação de Michaelis-Menten é denominada **equação de Lineweaver-Burk**. No caso das enzimas que obedecem a relação de Michaelis-Menten, um gráfico de $1/V_0$ versus $1/[S]$ (o “duplo-recíproco” do gráfico V_0 versus $[S]$ que foi usado até agora) produz uma linha reta (Figura Q-1). Essa reta tem uma inclinação de K_m/V_{\max} , intersecção de $1/V_{\max}$ no eixo $1/V_0$ e intersecção de $-1/K_m$

no eixo $1/[S]$. A representação duplo-recíproca, também denominada gráfico de Lineweaver-Burk, tem a grande vantagem de permitir uma determinação mais acurada de V_{\max} , pois ela pode ser obtida apenas *aproximadamente* nos gráficos simples de V_0 versus $[S]$ (ver Figura 6-12).

Outras transformações da equação de Michaelis-Menten são feitas, cada uma com uma vantagem específica para a análise de dados cinéticos. (Ver Problema 16 no final deste capítulo.)

O gráfico duplo-recíproco das velocidades de uma reação enzimática é muito útil para diferenciar certos tipos de mecanismos de reação enzimática (ver Figura 6-14) e na análise da inibição de enzimas (ver Quadro 6-2).

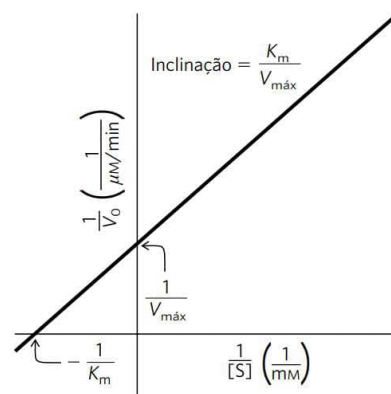


FIGURA Q-1 Gráfico duplo-recíproco, ou gráfico de Lineweaver-Burk.

K_m é usado (em geral, inapropriadamente) como indicador da afinidade da enzima pelo seu substrato. O significado verdadeiro da K_m depende de aspectos específicos do mecanismo da reação, como o número e as velocidades relativas das várias etapas. Para uma reação de duas etapas,

$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \quad (6-24)$$

Quando k_2 é a etapa limitante da reação, $k_2 \ll k_{-1}$ e K_m é reduzido a k_{-1}/k_1 , que é definido como a **constante de**

dissociação, K_d , do complexo ES. Nessas condições, K_m representa uma medida da afinidade da enzima pelo substrato no complexo ES. Entretanto, esse cenário não se aplica para a maioria das enzimas. Algumas vezes, $k_2 \gg k_{-1}$ e, consequentemente, $K_m = k_2/k_1$. Em outros casos, k_2 e k_{-1} são comparáveis, e K_m torna-se uma função mais complexa de todas as três constantes de velocidade (Equação 6-24). A equação de Michaelis-Menten e o comportamento característico de saturação continuam válidos, mas K_m não pode ser considerado como uma simples medida da afinidade da enzima pelo substrato. Ainda mais comuns são casos nos quais a reação ocorre em várias etapas após a formação de ES; nestes casos, a K_m pode se tornar uma função muito complexa composta de muitas constantes de velocidade.

A grandeza V_{\max} também varia muito de enzima para enzima. Se uma enzima reage pelo mecanismo de duas etapas de Michaelis-Menten, então $V_{\max} = k_2[E_t]$, em que k_2 é a etapa limitante da velocidade da reação. Entretanto, o número de etapas da reação e a identidade das etapas limitantes da velocidade podem variar de acordo com a enzima. Por exemplo, no caso da situação muito comum em que o produto é liberado, $EP \rightarrow E + P$, a liberação do produto é a etapa limitante. No início da reação (quando $[P]$ é baixo), a reação total pode ser descrita pelo esquema

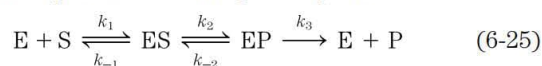


TABELA 6-6 K_m de algumas enzimas e seus substratos

Enzima	Substrato	K_m (mM)
Hexocinase (encéfalo)	ATP	0,4
	D-Glicose	0,05
	D-Fructose	1,5
Anidrase carbônica	HCO_3^-	26
Quimotripsina	Gliciltirosilglicina	108
	N-Benzoiltirosinamida	2,5
β -Galactosidase	D-Lactose	4,0
Treonina-desidratase	L-Treonina	5,0

TABELA 6-7 Número de renovação (*turnover*), k_{cat} , de algumas enzimas

Enzima	Substrato	k_{cat} (s^{-1})
Catalase	H_2O_2	40.000.000
Anidrase carbônica	HCO_3^-	400.000
Acetilcolinesterase	Acetilcolina	14.000
β -Lactamase	Benzilpenicilina	2.000
Fumarase	Fumarato	800
Proteína RecA (uma ATPase)	ATP	0,5

Nesse caso, na saturação, a maior parte da enzima está na forma EP e $V_{\text{máx}} = k_3[\text{E}_\text{t}]$. Isso é útil para definir uma constante de velocidade mais geral, k_{cat} , para descrever a etapa limitante de qualquer reação catalisada por enzimas na saturação. Se a reação tiver várias etapas e uma delas for claramente a etapa limitante da velocidade, k_{cat} equivale à constante de velocidade dessa etapa limitante. No caso de uma reação simples, como a Equação 6-10, $k_{\text{cat}} = k_2$. Para a reação da Equação 6-25, em que a liberação do produto é nitidamente a etapa limitante da velocidade, $k_{\text{cat}} = k_3$. Quando várias etapas são parcialmente limitantes, k_{cat} pode tornar-se uma função complexa com várias das constantes de velocidade que definem individualmente cada uma das etapas da reação. Na equação de Michaelis-Menten, $k_{\text{cat}} = V_{\text{máx}}/[\text{E}_\text{t}]$, e a Equação 6-9 torna-se

$$V_0 = \frac{k_{\text{cat}}[\text{E}_\text{t}][\text{S}]}{K_{\text{m}} + [\text{S}]} \quad (6-26)$$

A constante k_{cat} é a constante de primeira ordem da velocidade, tendo como unidade a recíproca do tempo. Essa constante também é chamada de **número de renovação** (*“turnover”*), e, quando a enzima estiver saturada com o substrato, ela é equivalente ao número de moléculas de substrato convertidas em produto por unidade de tempo por uma única molécula de enzima. Os números de renovação de muitas enzimas estão apresentados na Tabela 6-7.

Comparações entre mecanismos e eficiências de catálise Os parâmetros cinéticos k_{cat} e K_{m} são úteis para estudar e comparar enzimas diferentes, independentemente de se os mecanismos de reação são simples ou complexos. Cada enzima tem valores de k_{cat} e K_{m} que refletem o ambiente celular, a concentração de substrato normalmente encontrada *in vivo* pela enzima e a química da reação catalisada.

Os parâmetros k_{cat} e K_{m} também possibilitam que se avalie a eficiência cinética das enzimas, embora individualmente cada um desses parâmetros seja insuficiente para isso. Duas enzimas que catalisam reações diferentes podem ter a mesma k_{cat} (número de renovação), entretanto, as velocidades dessas reações quando não catalisadas podem ser diferentes entre si e, portanto, o aumento de velocidade propiciado por cada enzima pode ser muito diferente. Do ponto de vista experimental, a K_{m} de uma enzima tende a ser similar à concentração do substrato presente na célula. A K_{m} de uma enzima que atua sobre um substrato presente em concentrações muito baixas na célula geralmente é menor do que a K_{m} de uma enzima que age sobre um substrato mais abundante.

A melhor maneira de comparar as eficiências catalíticas de enzimas diferentes, ou o número de vezes que diferentes substratos são catalisados por uma mesma enzima, é comparar a relação $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ para as duas reações. Esse parâmetro, algumas vezes denominado **constante de especificidade**, é a constante de velocidade para a conversão de E + S para E + P. Quando $[\text{S}] \ll K_{\text{m}}$, a Equação 6-26 se reduz a

$$V_0 = \frac{k_{\text{cat}}}{K_{\text{m}}}[\text{E}_\text{t}][\text{S}] \quad (6-27)$$

Nesse caso, V_0 depende da concentração de dois reagentes, $[\text{E}_\text{t}]$ e $[\text{S}]$, uma equação de segunda ordem para a velocidade, e a constante $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ é uma constante de velocidade de segunda ordem, com unidades $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Existe um limite superior para $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$, imposto pela velocidade com que E e S podem se difundir em soluções aquosas. Esse limite imposto pela difusão se situa entre 10^8 e $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, sendo que muitas enzimas têm $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ nas proximidades dessa faixa (Tabela 6-8). Diz-se que essas enzimas atingiram a perfeição catalítica. Observe que diferentes valores de k_{cat} e K_{m} podem levar a essa relação máxima.

TABELA 6-8 Enzimas com $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ próximos do limite controlado pela difusão (10^8 a $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)

Enzima	Substrato	k_{cat} (s^{-1})	K_{m} (M)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
Acetilcolinesterase	Acetilcolina	$1,4 \times 10^4$	9×10^{-5}	$1,6 \times 10^8$
Anidrase carbônica	CO_2	1×10^6	$1,2 \times 10^{-2}$	$8,3 \times 10^7$
	HCO_3^-	4×10^5	$2,6 \times 10^{-2}$	$1,5 \times 10^7$
Catalase	H_2O_2	4×10^7	$1,1 \times 10^0$	4×10^7
Crotonase	Crotonil-CoA	$5,7 \times 10^3$	2×10^{-5}	$2,8 \times 10^8$
Fumarase	Fumarato	8×10^2	5×10^{-6}	$1,6 \times 10^8$
	Malato	9×10^2	$2,5 \times 10^{-5}$	$3,6 \times 10^7$
β -Lactamase	Benzilpenicilina	$2,0 \times 10^3$	2×10^{-5}	1×10^8

Fonte: A. Fersht, *Structure and Mechanism in Protein Science*, p. 166, W. H. Freeman and Company, 1999.

PROBLEMA 6-1 Determinação da K_m

Foi descoberta uma enzima que catalisa a reação química



Uma equipe de pesquisadores motivados dedicou-se a estudar essa enzima, que denominaram felicidade. Eles descobriram que a k_{cat} para a felicidade é 600 s^{-1} e fizeram ainda mais experimentos.

Quando $[E_t] = 20 \text{ nM}$ e $[\text{TRISTEZA}] = 40 \text{ }\mu\text{M}$, a velocidade da reação, V_0 , é $9,6 \text{ }\mu\text{M s}^{-1}$. Calcule a K_m para o substrato TRISTEZA.

Solução: k_{cat} , $[E_t]$, $[S]$ e V_0 são conhecidos e deseja-se saber o valor de K_m . A Equação 6-26, na qual a equação de Michaelis-Menten tem $V_{\text{máx}}$ substituída por $k_{\text{cat}}[E_t]$, é a mais apropriada para resolver este problema. Substituindo os valores na Equação 6-26 pode-se obter o valor de K_m .

$$\begin{aligned} V_0 &= \frac{k_{\text{cat}}[E_t][S]}{K_m + [S]} \\ 9,6 \text{ }\mu\text{M s}^{-1} &= \frac{(600 \text{ s}^{-1})(0,020 \text{ }\mu\text{M})(40 \text{ }\mu\text{M})}{K_m + 40 \text{ }\mu\text{M}} \\ 9,6 \text{ }\mu\text{M s}^{-1} &= \frac{480 \text{ }\mu\text{M}^2 \text{ s}^{-1}}{K_m + 40 \text{ }\mu\text{M}} \\ 9,6 \text{ }\mu\text{M s}^{-1}(K_m + 40 \text{ }\mu\text{M}) &= 480 \text{ }\mu\text{M}^2 \text{ s}^{-1} \\ K_m + 40 \text{ }\mu\text{M} &= \frac{480 \text{ }\mu\text{M}^2 \text{ s}^{-1}}{9,6 \text{ }\mu\text{M s}^{-1}} \\ K_m + 40 \text{ }\mu\text{M} &= 50 \text{ }\mu\text{M} \\ K_m &= 50 \text{ }\mu\text{M} - 40 \text{ }\mu\text{M} \\ K_m &= 10 \text{ }\mu\text{M} \end{aligned}$$

Após obter experiência em trabalhar com essa equação, é possível identificar atalhos para resolver problemas como este. Por exemplo, calcule $V_{\text{máx}}$ sabendo que $k_{\text{cat}}[E_t] = V_{\text{máx}}$ (neste caso, $600 \text{ s}^{-1} \times 0,020 \text{ }\mu\text{M} = 12 \text{ }\mu\text{M s}^{-1}$). Um rearranjo simples da Equação 6-26 pela divisão de ambos os lados por $V_{\text{máx}}$ dá

$$\frac{V_0}{V_{\text{máx}}} = \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

Assim, a razão $V_0/V_{\text{máx}} = 9,6 \text{ }\mu\text{M s}^{-1}/12 \text{ }\mu\text{M s}^{-1} = [S]/(K_m + [S])$. Isso simplifica o processo de calcular a K_m , dando $0,25[S]$, ou $10 \text{ }\mu\text{M}$.

PROBLEMA 6-2 Determinação de $[S]$

Em um conjunto separado de experimentos com a felicidade usando $[E_t] = 10 \text{ mM}$, a velocidade da reação, V_0 , foi medida e resultou em $3 \text{ }\mu\text{M s}^{-1}$. Qual a $[S]$ usada nesse experimento?

Solução: usando a mesma lógica do Problema 6-1, foi observado que $V_{\text{máx}}$ para essa concentração de enzima é $6 \text{ }\mu\text{M s}^{-1}$. Observe que a V_0 é exatamente metade da $V_{\text{máx}}$. Lembre-se que K_m , por definição, é igual a $[S]$ quando $V_0 = \frac{1}{2}V_{\text{máx}}$. Assim, nesse exemplo, a $[S]$ deve ser a mesma que K_m , ou $10 \text{ }\mu\text{M}$.

Caso V_0 tiver outro valor que não $\frac{1}{2}V_{\text{máx}}$, o mais simples para calcular $[S]$ é usar a expressão $V_0/V_{\text{máx}} = [S]/(K_m + [S])$.

Muitas enzimas catalisam reações com dois ou mais substratos

Vimos como $[S]$ afeta a velocidade de uma reação enzimática simples com apenas uma molécula de substrato ($S \rightarrow P$). Na maioria das reações enzimáticas, entretanto, duas (e algumas vezes mais) moléculas de substratos diferentes ligam-se à enzima e participam da reação. Quase dois terços das reações enzimáticas possuem dois substratos e dois produtos. Em geral, são reações nas quais um grupo é transferido de um substrato para outro ou um substrato é oxidado enquanto o outro é reduzido. Por exemplo, na reação catalisada pela hexocinase, os substratos são moléculas de ATP e glicose e os produtos são ADP e glicose-6-fosfato:

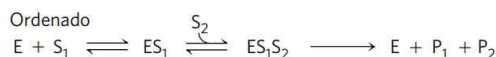


Há transferência de um grupo fosforila do ATP para a glicose. As velocidades dessas reações de bissubstrato também podem ser analisadas pela abordagem de Michaelis-Menten. A hexocinase tem uma K_m característica para cada um dos seus substratos (Tabela 6-6).

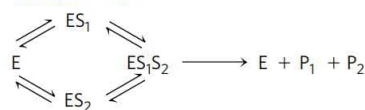
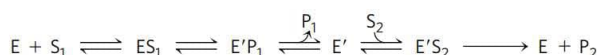
As reações enzimáticas ocorrem seguindo um mecanismo entre vários possíveis. Em alguns casos, ambos os substratos ligam-se à enzima simultaneamente em algum ponto do curso da reação, formando um complexo não covalente ternário (**Figura 6-13a**). Os substratos ligam-se segundo uma sequência aleatória ou em uma sequência com ordem específica. Em outros casos, o primeiro substrato é convertido em um produto que se dissocia antes que o segundo substrato se ligue, de modo que não há formação de um complexo ternário. Um exemplo desse último caso é o mecanismo de pingue-pongue, ou de deslocamento duplo (**Figura 6-13b**).

A notação proposta por W. W. Cleland pode ajudar a descrever reações com vários substratos e produtos. Nesse sistema, conhecido como **nomenclatura de Cleland**, os substratos são representados por A, B, C e D segundo a ordem com a qual eles se ligam na enzima, e os produtos por P, Q, S, T, segundo a ordem na qual eles dissociam da enzima. As reações enzimáticas com um, dois, três e quatro substratos são denominadas uni, bi, ter e tetra, respectivamente. A enzima, como é comum, é denominada E, mas se ela sofrer modificações no curso da reação, as formas sucessivas são representadas por F, G, e assim por diante. O progresso da reação é indicado por uma linha horizontal e as espécies químicas que se sucedem são indicadas abaixo da linha. A linha horizontal é bifurcada, caso exista uma alternativa para o caminho da reação. As etapas envolvendo ligação e dissociação de substratos e produtos são indicadas por linhas verticais.

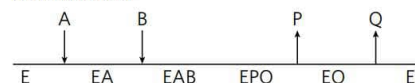
Reações com dois substratos e dois produtos (bi bi) são descritas conforme a notação ilustrada na Figura 16-13c para uma reação bi bi ordenada e uma reação bi bi aleatória. No último exemplo, a liberação do produto também é aleatória e está indicada pelas duas setas de bifurcação. Raramente, a ligação de substratos é ordenada, e a liberação dos produtos aleatória, ou vice-versa, eliminando a bifurcação de uma das extremidades da linha. Em reações pingue-pon-

(a) Reação enzimática envolvendo um grupo ternário

Ordem aleatória

**(b) Reação enzimática na qual não há formação de um complexo ternário****(c) Nomenclatura de Cleland**

Ordenado bi bi



Aleatória bi bi

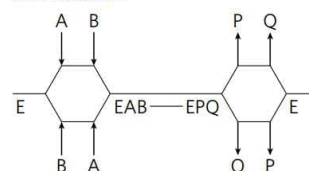
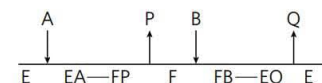
**(d) Pingue-pongue na nomenclatura de Cleland**

FIGURA 6-13 Mecanismo comum das reações bissubstrato catalisadas por enzimas. (a) A enzima e ambos os substratos juntam-se, formando um complexo ternário. No caso de ligação ordenada, o substrato 1 deve se ligar antes que o substrato 2 se ligue de modo produtivo. No caso de ligação ao acaso, os substratos podem se ligar em qualquer ordem. (b) Há a formação de um complexo enzima-substrato, o produto deixa o complexo, a enzima modificada forma um segundo complexo com a molécula do outro substrato, o segundo produto é liberado e a enzima é regenerada. O substrato 1 pode transferir um grupo funcional para a enzima (formando uma enzima modificada covalentemente, E9) que, depois, é transferido para o substrato 2. Esse mecanismo é denominado mecanismo de pingue-pongue ou mecanismo de deslocamento duplo. (c) Formação de um complexo ternário usando a nomenclatura de Cleland. Nas reações ordenadas bi bi e nas reações aleatórias bi bi, mostradas aqui, a liberação do produto segue o mesmo padrão da ligação dos substratos, ambos ordenados ou ambos aleatórios. (d) Reação pingue-pongue ou reação de deslocamento duplo descrita com a nomenclatura de Cleland.

gue, não há complexo ternário, o caminho da reação tem uma segunda forma da enzima, F, que é transitória (Figura 6-13d). Essa é a forma pela qual um grupo é transferido de um primeiro substrato A para a enzima para formar uma associação covalente transitória com a enzima. Como foi visto acima, essas reações geralmente são denominadas reações de deslocamento duplo, pois um grupo é transferido primeiro do substrato A para a enzima e então para o substrato B. Os substratos A e B nunca se encontram juntos na enzima.

A cinética de estado estacionário de Michaelis-Menten dá apenas informações limitadas sobre o número de etapas e intermediários da reação enzimática, mas pode ser usada para diferenciar entre mecanismos que têm intermediários terciários e mecanismos, incluindo pingue-pongue, que não têm intermediário terciário (Figura 6-14). Será visto na

discussão sobre inibição enzimática que a cinética do estado estacionário também serve para diferenciar entre ligação ordenada ao substrato e aos produtos e ligação aleatória nas reações que possuem intermediários terciários.

A atividade enzimática depende do pH

Em geral, a cinética do estado estacionário dá as informações necessárias para caracterizar uma enzima e determinar a sua eficiência catalítica. Mais informações podem ser obtidas examinando como os parâmetros experimentais chave k_{cat} e k_{cat}/K_m se alteram quando as condições da reação, sobretudo o pH, se alteram. As enzimas têm um pH (ou uma faixa de pH) ótimo no qual a atividade catalítica é máxima (Figura 6-15); em pH maior ou menor a atividade diminui. Isso não é surpreendente.

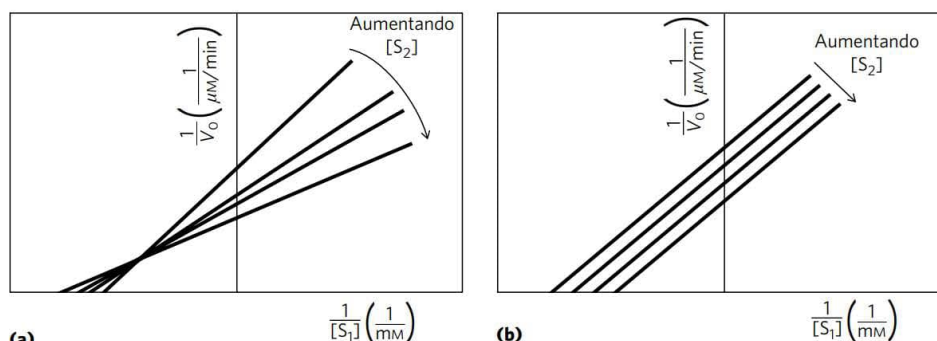


FIGURA 6-14 Análise da cinética de estado estacionário das reações bissubstrato. Nestes gráficos duplo-recíprocos (ver Quadro 6-1), a concentração do substrato 1 varia, ao passo que a concentração do substrato 2 é mantida constante. Isso se repete para vários valores de $[S_2]$, dando várias curvas separadas. (a) Retas que se interceptam indicam que um complexo ternário foi formado na reação; (b) retas paralelas indicam uma via pingue-pongue (deslocamento duplo).

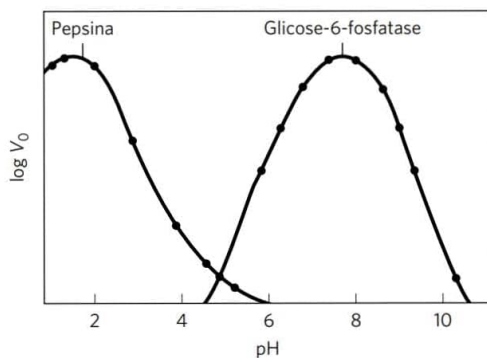


FIGURA 6-15 Perfil de atividade em função do pH de duas enzimas.

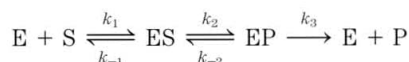
As curvas foram construídas a partir de medidas das velocidades iniciais, e as reações foram feitas em tampões com pH diferentes. As mudanças na V_0 estão colocadas em escala logarítmica, uma vez que a escala de pH é logarítmica e reflete uma mudança de 10 vezes na $[H^+]$. O pH ótimo da atividade de uma enzima geralmente é próximo ao pH do ambiente no qual a enzima costuma ser encontrada. A pepsina, peptidase encontrada no estômago, tem pH ótimo de cerca de 1,6. O pH do suco gástrico situa-se entre 1 e 2. A glicose-6-fosfatase dos hepatócitos (células do fígado), com pH ótimo de cerca de 7,8, é responsável pela liberação de glicose na corrente sanguínea. O pH normal do citosol dos hepatócitos é de cerca de 7,2.

As cadeias laterais dos aminoácidos do sítio ativo podem agir como ácidos fracos ou bases fracas somente se mantiverem certo grau de ionização. Em outras regiões da proteína, a remoção de um próton de um resíduo de His, por exemplo, pode levar à eliminação de uma interação iônica essencial para a conformação ativa da enzima. Uma causa menos comum para a sensibilidade de uma enzima ao pH é a titulação de um grupo no substrato.

A faixa de pH na qual uma enzima sofre mudança na atividade pode fornecer uma pista para o tipo de resíduo de aminoácido envolvido (ver Tabela 3-1). Uma mudança de atividade próxima a pH 7,0, por exemplo, geralmente reflete a titulação de um resíduo de His. Contudo, os efeitos do pH devem ser interpretados com cautela. No ambiente altamente compacto e confinado das proteínas, os valores de pK_a das cadeias laterais das proteínas podem estar alterados de modo significativo. Por exemplo, uma carga positiva que esteja próxima pode diminuir o pK_a de um resíduo de Lys, e uma carga negativa nas proximidades pode aumentá-lo. Algumas vezes, esses efeitos resultam em um valor de pK_a desviado por várias ordens de grandeza do valor quando o aminoácido está livre. Por exemplo, na enzima acetoacetato Descarboxilase, devido aos efeitos eletrostáticos das cargas positivas presentes nas proximidades de um resíduo de Lys, esse resíduo de Lys tem pK_a de 6,6 (comparado com 10,5 na lisina livre).

A cinética do estado pré-estacionário pode fornecer evidências de etapas específicas das reações

As informações que a cinética de estado estacionário dá podem, algumas vezes, ser aumentadas enormemente examinando-se o estado pré-estacionário. Considerando-se, por exemplo, uma enzima com um mecanismo de reação em conformidade com o esquema da Equação 6-25, com três etapas:



A eficiência catalítica final dessa reação pode ser obtida pela cinética do estado estacionário, mas a velocidade de cada uma das etapas intermediárias não pode ser determinada analisando-se essa cinética, e a etapa de menor velocidade (a etapa que limita a velocidade da reação) raramente pode ser identificada. Para medir as constantes de velocidade de cada uma das etapas deve-se estudar o estado pré-estacionário. O primeiro ciclo de catálise enzimática geralmente ocorre em segundos ou milissegundos, de modo que os pesquisadores precisam de um equipamento especial que permita misturar e tirar amostras nesta escala de tempo (**Figura 6-16a**). A reação é interrompida e os produtos ligados às proteínas são quantificados pela adição e mistura rápida de um ácido que desnatura a proteína e libera todas as moléculas a elas ligadas. Embora uma descrição detalhada da cinética do estado pré-estacionário esteja além do âmbito deste livro, pode-se ilustrar o poder desse tipo de experimento com um exemplo simples, uma enzima que usa o caminho de reação descrito pela Equação 6-25. Esse exemplo também abrange uma enzima que catalisa uma reação relativamente lenta, de modo que é mais fácil observar o estado pré-estacionário.

No caso de muitas enzimas, a dissociação do produto é a etapa limitante da velocidade. Nesse exemplo (**Figura 6-16b, c**), a velocidade de dissociação do produto (k_3) é menor do que a velocidade com que é formado (k_2). Portanto, a dissociação do produto é que determina o estado estacionário observado. Como é que se pode saber que k_3 é a etapa limitante da velocidade? Um k_3 baixo origina um pulso de formação de produto no estado pré-estacionário porque as etapas anteriores são relativamente rápidas. Esse pulso reflete a rapidez da conversão de uma molécula de substrato em uma molécula de produto no sítio ativo de cada molécula de enzima presente. A velocidade de formação do produto que se observa diminui para a velocidade do estado estacionário à medida que o produto ligado é liberado mais lentamente. Cada ciclo de catálise (*turnover*) que vier depois deve ocorrer por meio desta etapa lenta de liberação do produto. Contudo, a rápida geração de produto no primeiro ciclo de catálise fornece muita informação. A amplitude do pulso – quando uma molécula do produto é gerada por uma molécula de enzima presente (**Figura 6-16c**), medida pela extrapolação da curva do estado estacionário para o tempo zero – é a maior possível. Isso fornece uma evidência de que a liberação do produto é realmente a etapa limitante da velocidade. A constante de velocidade para uma etapa química da reação, k_2 , pode ser obtida medindo-se a velocidade do pulso. É claro, porém, que nem sempre as enzimas seguem esquemas simples de reação como o da Equação 6-25. Formalmente, a observação de um pulso indica que a etapa limitante da velocidade (normalmente liberação do produto, mudança de conformação na enzima ou alguma outra etapa química) ocorre depois que a formação do produto foi monitorada. Todavia, experimentos e análises geralmente podem definir a velocidade de cada uma das etapas das reações enzimáticas com várias etapas. Alguns exemplos da aplicação da cinética do estado pré-estacionário estão incluídos na descrição de enzimas específicas apresentada na Seção 6.4.

As enzimas estão sujeitas à inibição reversível ou irreversível

Inibidores de enzimas são moléculas que interferem com a catálise, diminuindo ou interrompendo as reações enzimáticas.

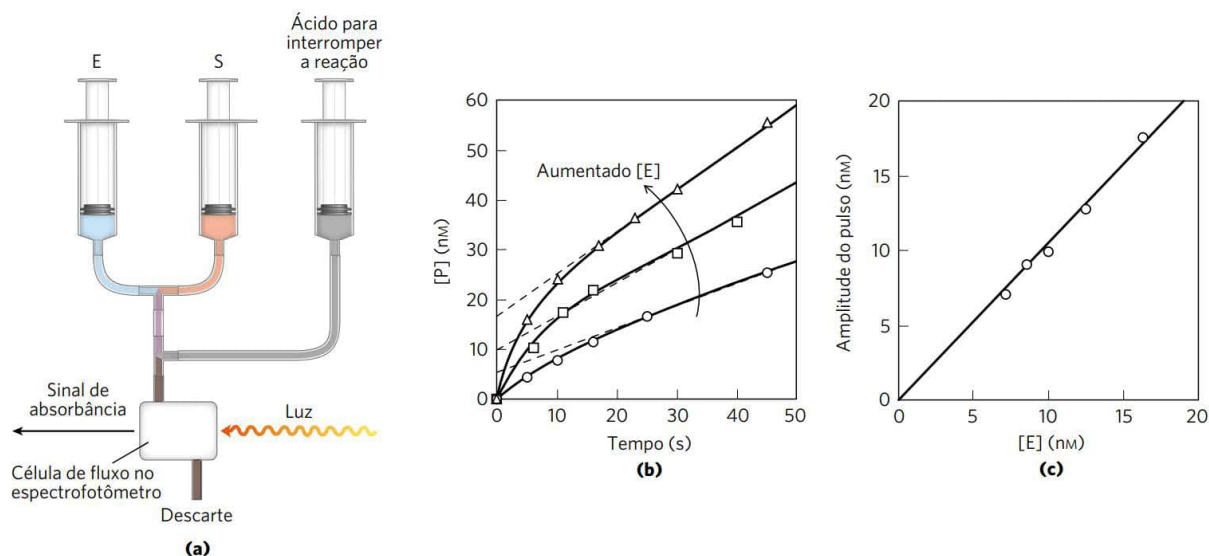


FIGURA 6-16 Cinética do estado pré-estacionário. A fase transitente que constitui o estado pré-estacionário geralmente existe apenas poucos segundos ou milissegundos, sendo necessário utilizar equipamentos especializados para monitorá-la. **(a)** Esquema simples de aparelho para mistura rápida, denominado “stopped-flow”. A enzima (E) e o substrato (S) são misturados com a ajuda de seringas operadas mecanicamente. A reação é interrompida, em um momento programado, pela adição de ácido por meio de outra seringa, e a quantidade de produto formado é medida, neste caso, com um espectrofotômetro. **(b)** Dados experimentais de uma reação enzimática, mostrando que o estado pré-estacionário ocorre nos primeiros 5 a 10 segundos. Essa é uma reação relativamente lenta e é usada como exemplo porque o estado estacionário pode ser monitorado facilmente. A inclinação da curva depois de 15 segundos reflete o estado estacionário. Extrapolando esta inclinação para o tempo zero (linhas tracejadas) obtém-se a amplitude da fase de pulso. O prosseguimento da reação durante o estado pré-estacionário reflete primariamente as etapas químicas na reação (não estão mostrados detalhes). A existência do pulso implica que a seguir vem uma etapa química que produz P e que essa é a etapa limitante da velocidade – neste caso, a etapa de liberação do produto. Observe que a extrapolação para o tempo = 0 aumenta à medida que [E] aumenta. **(c)** O gráfico da amplitude do pulso (intersecção de (b)) contra [E] mostra que uma molécula de P é formada em cada sítio ativo durante a fase de pulso (estado pré-estacionário). Isso evidencia que a etapa 3, liberação do produto, é a etapa limitante da velocidade, uma vez que, nessa reação enzimática simples, essa é única etapa após a formação do produto. A enzima utilizada nesse experimento foi a RNase P, um dos RNAs catalíticos descritos no Capítulo 26. [Fonte: (b, c) dados de J. Hsieh et al., *RNA* 15:224, 2009.]

As enzimas catalisam quase todos os processos celulares, então não deve surpreender que os inibidores de enzimas estejam entre os medicamentos mais importantes. Por exemplo, o ácido acetilsalicílico inibe a enzima que catalisa a primeira etapa da síntese das prostaglandinas, compostos envolvidos em vários processos, inclusive alguns que produzem dor. O estudo dos inibidores enzimáticos também fornece rica informação sobre os mecanismos enzimáticos e tem ajudado a desvendar algumas vias metabólicas. Existem duas classes amplas de inibidores de enzimas: reversíveis e irreversíveis.

Inibição reversível Um tipo muito comum de **inibição reversível** é denominado inibição competitiva (**Figura 6-17a**). Um **inibidor competitivo** compete com o substrato pelo sítio ativo da enzima. Enquanto o inibidor (I) estiver ocupando o sítio ativo, ele impede que o substrato se ligue à enzima. Muitos inibidores competitivos têm estrutura similar à estrutura do substrato e se combinam com a enzima, formando um complexo EI, mas que não leva à catálise. Mesmo ligações desse tipo que sejam transitórias reduzem a eficiência da enzima. Tomando como base a geometria da molécula do inibidor, pode-se chegar a conclusões sobre quais partes do substrato normal se ligam à enzima. A inibição competitiva pode ser analisada quantitativamente usando cinética do estado estacionário. Na presença de um inibidor competitivo, a equação de Michaelis-Menten (Equação 6-9) torna-se

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{\alpha K_m + [S]} \quad (6-28)$$

em que

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I} \quad \text{e} \quad K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

A Equação 6-28 descreve características importantes da inibição competitiva. A variável determinada experimentalmente αK_m , a K_m observada na presença de inibidor é geralmente denominada K_m aparente (“app”).

A ligação do inibidor não inativa a enzima. Quando o inibidor dissocia, o substrato pode ligar e reagir. Uma vez que o inibidor se liga reversivelmente à enzima, a competição pode ser deslocada em favor do substrato simplesmente adicionando-se mais substrato. Quando [S] exceder em muito a [I], a probabilidade de que uma molécula de inibidor se ligue à enzima fica minimizada, e a reação apresenta V_{\max} normal. Contudo, na presença do inibidor, é preciso uma alta concentração do substrato para a velocidade se aproximar da V_{\max} . Na [S] na qual $V_0 = \frac{1}{2}V_{\max}$, a K_m aparente aumenta na presença do inibidor por um fator α . Esse efeito na K_m aparente, combinado com a ausência de efeito sobre V_{\max} , diagnostica uma inibição competitiva, e isso é facilmente revelado por meio do gráfico duplo-recíproco (Quadro 6-2). A constante de equilíbrio para a ligação do inibidor (K_I) pode ser obtida a partir do mesmo gráfico.

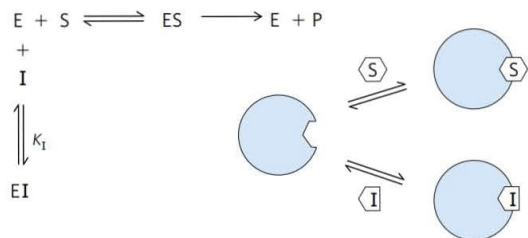
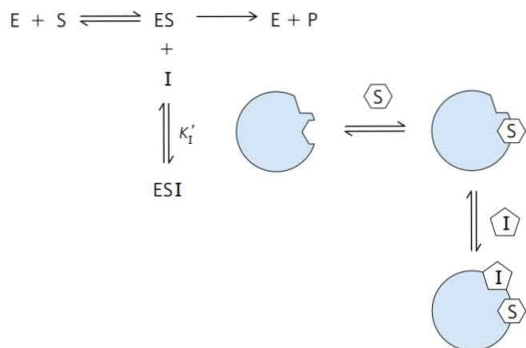
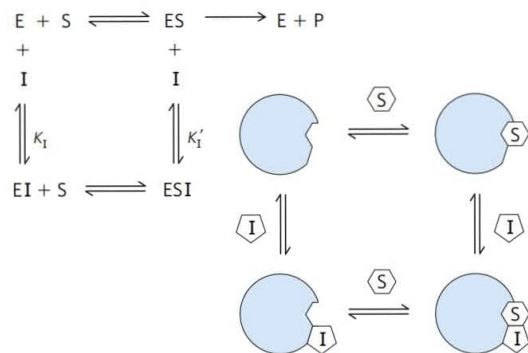
(a) Inibição competitiva**(b) Inibição incompetitiva****(c) Inibição mista**

FIGURA 6-17 Três tipos de inibição reversível. **(a)** Inibidores competitivos ligam-se ao sítio ativo da enzima; K_I é a constante de equilíbrio da ligação do inibidor a E. **(b)** Inibidores incompetitivos ligam-se em sítios separados, mas se ligam apenas ao complexo ES; K'_I é a constante de equilíbrio para a ligação a ES. **(c)** Inibidores mistos ligam-se em sítios separados, mas podem se ligar tanto a E quanto a ES.



Uma terapia utilizada para tratar pacientes que ingeriram metanol, um solvente anticongelante utilizado em dutos de gás, tem como base a competição pelo sítio ativo. A álcool-desidrogenase hepática converte metanol em formaldeído, que é prejudicial para muitos tecidos. A cegueira é uma consequência muito comum da ingestão de metanol, pois os olhos são especialmente sensíveis ao formaldeído. O etanol compete de maneira eficiente com o metanol como substrato alternativo da álcool-desidrogenase. O etanol tem o efeito de um inibidor competitivo, com a diferença de que o etanol também é substrato para a álcool-desidrogenase, e a sua concentração diminui à medida que a enzima o converte em acetaldeído. O tratamento do envenenamento por metanol é feito pela administração intrave-

nosa lenta de etanol a uma velocidade adequada para manter uma concentração controlada de etanol no sangue por várias horas. A velocidade de formação de formaldeído diminui, e, durante esse tempo, os rins filtram o metanol, que é excretado inocuaemente na urina. ■

Dois outros tipos de inibidores reversíveis, incompetitivos e mistos podem ser definidos para o caso de enzimas de um único substrato, porém, na prática, são observadas apenas enzimas com dois ou mais substratos. Um **inibidor incompetitivo** (Figura 6-15b) liga-se em um sítio distinto do sítio ativo do substrato e, ao contrário do inibidor competitivo, liga-se apenas ao complexo ES. Na presença de um inibidor incompetitivo, a equação de Michaelis-Menten altera-se para

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + \alpha'[S]} \quad (6-29)$$

em que

$$\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K'_I} \quad \text{e} \quad K'_I = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

A Equação 6-29 descreve que, em altas concentrações de substrato, a V_0 aproxima-se de V_{\max}/α' . Então, um inibidor incompetitivo diminui a V_{\max} que é medida. A K_m aparente também diminui, porque a $[S]$ necessária para atingir metade da V_{\max} diminui por um fator α' . Esse comportamento pode ser explicado da seguinte maneira: como a enzima fica inativa quando um inibidor incompetitivo se liga, mas o inibidor não compete com o substrato pela ligação, o inibidor retira da reação uma parte das moléculas de enzima. Uma vez que V_{\max} depende de $[E]$, a V_{\max} observada diminui e, dado que o inibidor liga-se apenas ao complexo ES, apenas ES (e não a enzima livre) é retirado da reação. Assim a $[S]$ necessária para atingir $\frac{1}{2}V_{\max}$ (i.e., K_m) diminui pelo mesmo tanto.

Também no caso de um **inibidor misto** (Figura 6-15c) há ligação a um sítio distinto do sítio ativo, ao qual o substrato se liga. Nesse caso, o inibidor pode ligar-se tanto à enzima quanto a ES. A equação de velocidade que descreve a inibição mista é

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{\alpha K_m + \alpha'[S]} \quad (6-30)$$

em que α e α' foram definidos acima. Em geral, o inibidor afeta ambas, K_m e V_{\max} . Só há efeito na V_{\max} porque o inibidor faz uma parte das moléculas de enzima presentes ficar inativa, diminuindo a $[E]$ efetiva da qual V_{\max} depende. A K_m pode aumentar ou diminuir, dependendo de qual das formas da enzima, E ou ES, o inibidor liga mais fortemente. O caso especial $\alpha = \alpha'$, encontrado raramente experimentalmente, é classicamente definido como **inibição não competitiva**. O exame da Equação 6-30 mostra por que um inibidor não competitivo afeta V_{\max} , mas não K_m .

A equação 6-30 é a expressão geral dos efeitos de inibidores reversíveis, simplificando para as expressões da inibição competitiva e incompetitiva quando $\alpha' = 1,0$ ou $\alpha = 1,0$, respectivamente. A partir dessa expressão, pode-se resumir os efeitos dos inibidores sobre cada um dos parâmetros cinéticos. No caso dos inibidores reversíveis,

QUADRO 6-2 Testes cinéticos para determinar mecanismos de inibição

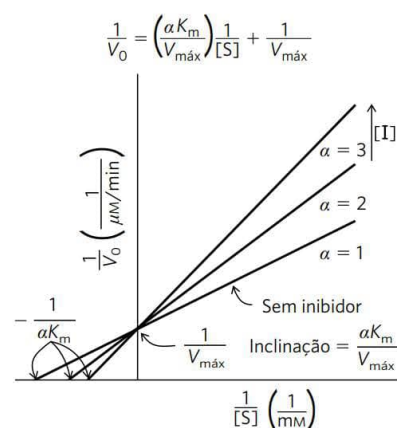
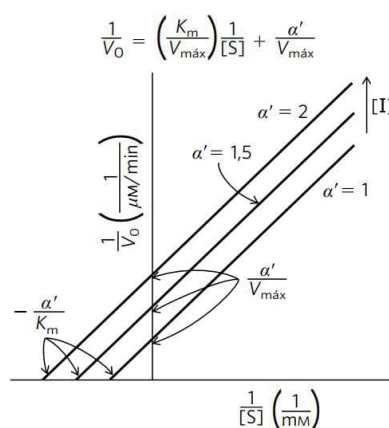
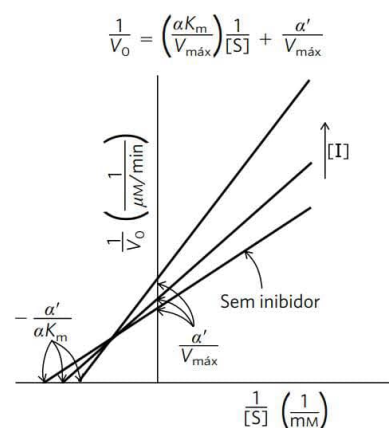
O gráfico duplo-recíproco (ver Quadro 6-1) permite determinar facilmente se o inibidor de uma enzima é competitivo, incompetitivo ou misto. Dois conjuntos de experimentos devem ser feitos, com a concentração de enzima mantida constante em cada conjunto. No primeiro conjunto de experimentos, $[S]$ também é mantida constante, o que permite medir o efeito do aumento da concentração do inibidor $[I]$ sobre a velocidade inicial $V_{\text{máx}}$ (não mostrada na figura). No segundo conjunto de experimentos, $[I]$ é mantida constante e $[S]$ varia. Os resultados são colocados em um gráfico $1/V_0$ versus $1/[S]$.

A Figura Q-1 mostra um conjunto de gráficos duplo-recíprocos, um obtido na ausência de inibidor e dois com diferentes concentrações de um inibidor competitivo. O aumento na $[I]$ produz uma família de curvas, todas com uma intersecção comum no eixo $1/V_0$, mas com inclinações diferentes. Como a intersecção no eixo $1/V_0$ é igual a $1/V_{\text{máx}}$, sabe-se que $V_{\text{máx}}$ não é modificada pela

presença de um inibidor competitivo. Isto é, independentemente de qual seja a concentração do inibidor competitivo, haverá uma concentração de substrato alta o suficiente que deslocará o inibidor do sítio ativo da enzima. Na parte superior do gráfico é apresentado o rearranjo da Equação 6-28 que serviu de base para construir o gráfico. O valor de α pode ser calculado a partir da mudança na inclinação da curva em qualquer valor de $[I]$. A partir dessa expressão, pode-se calcular K_i desde que se conheça α .

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i}$$

No caso da inibição incompetitiva e da inibição mista, gráficos similares com dados de velocidades produzem as famílias de retas mostradas nas Figuras Q-2 e Q-3. Mudanças nas intersecções nos eixos sinalizam mudanças em $V_{\text{máx}}$ e K_m .

**FIGURA Q-1** Inibição competitiva.**FIGURA Q-2** Inibição incompetitiva.**FIGURA Q-3** Inibição mista.

$V_{\text{máx}} = V_{\text{máx}}/\alpha'$ porque o lado direito da Equação 6-30 pode ser simplificado para $V_{\text{máx}}/\alpha'$ quando as concentrações de substrato forem suficientemente altas. Para inibidores competitivos $\alpha' = 1,0$ e, portanto, pode ser ignorado. Tomando essa expressão pela $V_{\text{máx}}$ aparente, pode-se deduzir uma expressão geral para K_m aparente, que mostra como esse parâmetro se modifica pela presença de inibidores reversíveis. Como a K_m aparente sempre é igual a $[S]$ na qual a V_0 é metade da $V_{\text{máx}}$ aparente, ou, de um modo mais geral, quando a $V_0 = V_{\text{máx}}/2\alpha'$. Essa condição é satisfeita quando $[S] = \alpha K_m/\alpha'$. Desse modo, a K_m aparente $= \alpha K_m/\alpha'$. Os termos α e α' refletem a ligação de um inibidor à E e a ES, respectivamente. Então, o termo $\alpha K_m/\alpha'$ é a expressão matemática da afinidade relativa do inibidor para as duas formas da enzima. A expressão fica simples quando α ou α' for 1,0 (no caso de inibidores incompetitivos ou competitivos), o que está resumido na Tabela 6-9.

Na prática, as inibições incompetitiva e mista são observadas apenas em enzimas com dois ou mais substratos, S_1 e S_2 , que são muito importantes na análise experimental dessas enzimas. Se um inibidor ligar-se ao sítio normalmente ocupado por S_1 , ele atuará como um inibidor

TABELA 6-9 Efeitos de inibidores reversíveis na $V_{\text{máx}}$ aparente e na K_m aparente

Tipo de inibidor	$V_{\text{máx}}$ aparente	K_m aparente
Nenhum	$V_{\text{máx}}$	K_m
Competitivo	$V_{\text{máx}}$	αK_m
Incompetitivo	$V_{\text{máx}}/\alpha'$	K_m/α'
Misto	$V_{\text{máx}}/\alpha'$	$\alpha K_m/\alpha'$

competitivo em experimentos nos quais $[S_1]$ varie. Se um inibidor liga-se ao sítio normalmente ocupado por S_2 , ele pode agir como um inibidor misto ou incompetitivo de S_1 . O padrão real de inibição observado dependerá de quanto os eventos de ligação de S_1 e S_2 forem ordenados ou aleatórios. Assim, a ordem de ligação dos substratos e a ordem com que os produtos deixam o sítio ativo podem ser determinadas. Experimentos de inibição pelo produto, nos quais um dos produtos da reação é adicionado como inibidor, são geralmente muito informativos. Se apenas um dos dois produtos da reação estiver presente, a reação inversa não ocorre. Contudo, um produto geralmente se liga a alguma parte do sítio ativo e, assim, pode atuar como um inibidor efetivo quando o segundo produto não estiver presente. Os enzimologistas podem combinar estudos cinéticos de estado estacionário usando combinações e quantidades de produtos diferentes em análises de estado pré-estacionário para ter uma ideia detalhada dos mecanismos de reação bissubstrato.

PROBLEMA 6-3 Efeito do inibidor sobre a K_m

Pesquisadores trabalhando com a enzima “felicidade” (ver Problemas 6-1 e 6-2) descobriram que o composto ESTRESSE é um potente inibidor competitivo da felicidade. A presença de ESTRESSE 1 nM aumenta o valor da K_m medido da TRISTEZA por um fator de 2. Quais são os valores de α e de α' nessas condições?

Solução: lembre-se que a K_m aparente e a K_m medida na presença de um inibidor competitivo são definidas como αK_m . Uma vez que a K_m para TRISTEZA aumenta por um fator de 2 na presença de ESTRESSE 1 nM, o valor de α deve ser 2. Por definição, o valor de α' para uma inibição competitiva é 1.

Inibição irreversível Os **inibidores irreversíveis** ligam-se covalentemente com ou destroem um grupo funcional da enzima essencial à atividade da enzima ou então formam uma associação não covalente estável. A formação de uma ligação covalente entre um inibidor irreversível e uma enzima é uma maneira especialmente efetiva de inativar uma enzima. Os inibidores irreversíveis são outra ferramenta útil para estudar mecanismos de reação. Algumas vezes, é possível identificar aminoácidos com funções-chave no sítio ativo determinando quais resíduos de aminoácidos se ligam covalentemente ao inibidor depois que a enzima é inativada. Um exemplo está mostrado na **Figura 6-18**.

Uma classe especial de inibidores irreversíveis é formada pelos **inativadores suicidas**. Esses compostos são relativamente não reativos até que se liguem ao sítio ativo de uma enzima específica. Um inativador suicida passa pelas primeiras etapas químicas de uma reação enzimática, porém, em vez de ser transformado no produto normal, é convertido em um composto muito reativo que se combina irreversivelmente com a enzima. Esses compostos também são denominados **inativadores com base no mecanismo**, pois sequestram o mecanismo normal da reação para inativar a enzima. Os inativadores suicidas

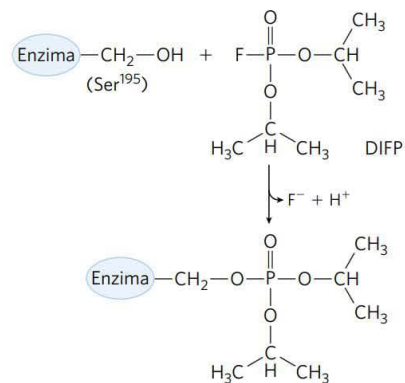


FIGURA 6-18 Inibição irreversível. Reação da quimotripsina com diisopropilfluorofosfato (DIFP), que modifica a Ser¹⁹⁵, irreversivelmente inibe a enzima. Isso leva à conclusão de que a Ser¹⁹⁵ é o resíduo de serina decisivo no sítio ativo da quimotripsina.

têm um papel significativo para a *planejamento racional de fármacos*, uma abordagem moderna com base no conhecimento dos substratos e dos mecanismos de reação e usada pelos químicos para sintetizar novos agentes farmacêuticos. Um inativador suicida bem planejado é específico para uma determinada enzima e permanece sem reatividade até se ligar no sítio ativo da enzima, de forma que os medicamentos desenvolvidos por meio dessa abordagem podem trazer uma vantagem significativa devido aos poucos efeitos colaterais (ver Quadro 6-3). Alguns exemplos de inibidores de importância médica estão descritos no fim da Seção 6.4.

Um inibidor irreversível não necessariamente deve se ligar covalentemente à enzima. Uma ligação não covalente seria suficiente, caso essa ligação seja tão forte que o inibidor só se dissociará muito raramente. Como os químicos desenvolvem inibidores que se ligam fortemente (“*tight-binding*”)? Inicialmente, é importante lembrar que as enzimas evoluíram de modo a se ligarem mais firmemente ao estado de transição das reações que catalisam. Em princípio, se alguém puder planejar uma molécula que se pareça com o estado de transição da reação, essa molécula se ligará fortemente à enzima. Mesmo que os estados de transição não possam ser observados diretamente, os químicos geralmente podem prever a estrutura aproximada do estado de transição com base no acúmulo do conhecimento sobre os mecanismos da reação. Embora o estado de transição seja, por definição, transiente e, portanto, instável, em alguns casos se pode planejar moléculas estáveis que se assemelhem aos estados de transição. Essas moléculas são denominadas **análogos do estado de transição**. Elas ligam-se à enzima mais fortemente do que o substrato no complexo ES, uma vez que elas se encaixam melhor no sítio ativo (i.e., formam um número maior de interações fracas) do que o próprio substrato. A ideia de análogos ao estado de transição foi proposta por Pauling na década de 1940 e vem sendo explorada no caso de muitas enzimas. Por exemplo, análogos ao estado de transição planejados para inibir a aldolase, enzima da via glicolítica, ligam-se à enzima mais firmemente do que os substratos por um fator de mais de quatro ordens de magnitude

QUADRO 6-3



MEDICINA

Curando a doença do sono com um cavalo de Tróia bioquímico

A doença do sono, ou tripanossomíase africana, é causada por protistas (eucarioto unicelular) denominados tripanossomos (Figura Q-1). Essa doença (e outras doenças causadas por tripanossomatídeos) tem importância médica e econômica em muitos países em desenvolvimento. A doença era praticamente incurável até o final do século XX. Vacinas eram ineficazes devido ao inusitado mecanismo de evasão ao sistema imune do hospedeiro que o parasita possui.

A camada que reveste as células dos tripanossomatídeos é coberta por uma única proteína que constitui o antígeno ao qual o sistema imune responde. Entretanto, por meio de um processo de recombinação genética (ver Tabela 28-1), a intervalos frequentes algumas células da população de tripanossomatídeos que estão infectando o hospedeiro mudam para uma nova proteína de revestimento, a qual não é reconhecida pelo sistema imune. Esse processo de “mudança de revestimento” pode ocorrer centenas de vezes. O resultado é uma infecção crônica cíclica: a pessoa acometida tem febre que persiste enquanto o sistema imune ataca a primeira infecção; os tripanossomos com o revestimento alterado tornam-se a semente de uma segunda infecção e a febre volta. Esse ciclo pode se repetir por semanas e a pessoa enfraquece, chegando, então, ao óbito.

Algumas das abordagens atuais para tratar a doença do sono se baseiam no conhecimento da enzimologia e do metabolismo. Ao menos uma dessas abordagens envolve agentes farmacêuticos planejados como inibidores desenhados como inativadores de enzimas com base no mecanismo (inativadores suicidas). Um ponto vulnerável do metabolismo dos tripanossomatídeos é a via de biossíntese de poliaminas. As poliaminas espermina e espermidina, que têm papel na compactação do DNA, são necessárias em grandes quantidades por células que estejam crescendo rápido. A primeira etapa da síntese é catalisada pela ornitina-decarboxilase, uma enzima que, para funcionar,

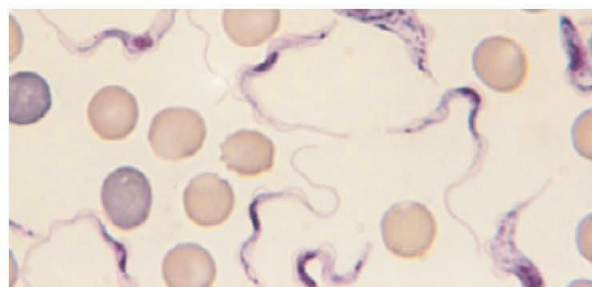


FIGURA Q-1 *Trypanosoma brucei rhodesiense*, um dos vários tripanossomatídeos que causam a doença do sono africana. [Fonte: John Mansfield, University of Wisconsin-Madison, Department of Bacteriology.]

precisa de uma coenzima denominada piridoxal-fosfato. O piridoxal-fosfato (PLP), que é um derivado da vitamina B6, faz uma ligação covalente com o aminoácido substrato da reação, agindo como um aceptor de elétrons, o que facilita um grande número de reações (ver Figura 22-32). Nas células de mamífero, a ornitina-decarboxilase tem um alto *turnover*, isto é, ciclos de degradação e síntese da enzima. Em alguns tripanossomatídeos, porém, a enzima, por razões não bem conhecidas, é estável. Ela não é substituída por novas enzimas recém-sintetizadas. Um inibidor da ornitina-decarboxilase que se ligue permanentemente à enzima teria pouco efeito sobre as células humanas, já que elas repõem rapidamente a enzima inativada, mas teria um efeito adverso no parasita.

As primeiras etapas da reação normalmente catalisada pela ornitina-decarboxilase estão mostradas na Figura Q-2. Uma vez liberado o CO_2 , o movimento de elétrons é revertido e há produção de putrescina (ver Figura 22-32). Com base nesse mecanismo, foram planejados vários inativadores suicidas, um deles é a difluoro-metilornitina (DFMO). A DFMO é relativamente inerte

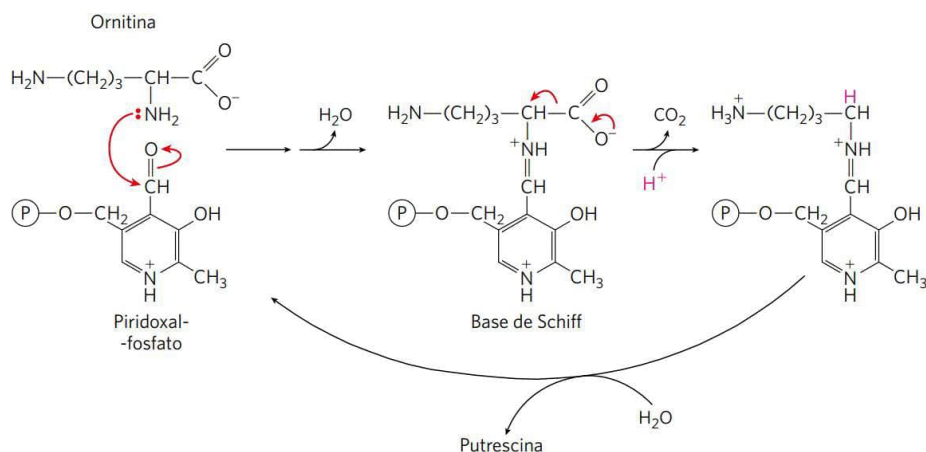


FIGURA Q-2 Mecanismo da reação da ornitina-decarboxilase.

(Continua)

QUADRO 6-3



MEDICINA

Curando a doença do sono com um cavalo de Tróia bioquímico (Continuação)

em solução. Quando ela se liga à ornitina-descarboxilase, a enzima é rapidamente inativada (Figura Q-3). O inibidor age proporcionando uma nova alternativa para receber os elétrons na forma dos dois átomos de

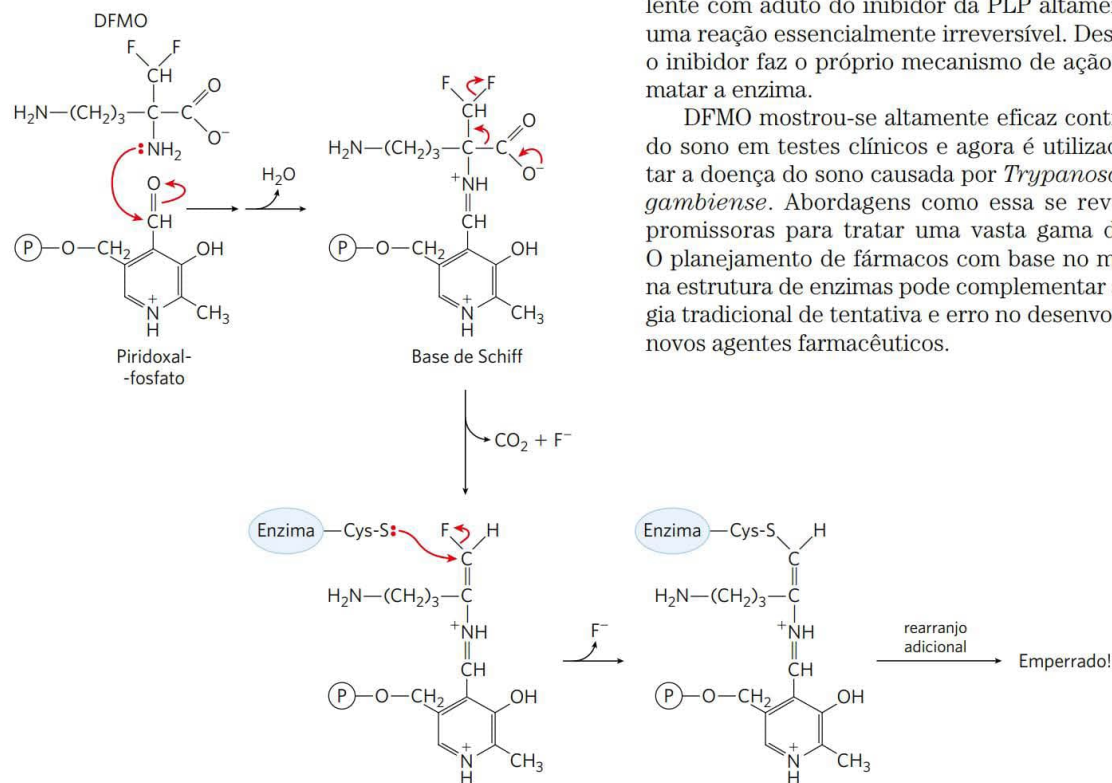


FIGURA Q-3 Inibição da ornitina-descarboxilase por DFMO.

flúor estrategicamente posicionados, que são excelentes grupos de saída. Em vez de fazer os elétrons se moverem para o anel da estrutura do PLP, a reação leva à liberação de um átomo de flúor. O S— de um resíduo de cisteína do sítio ativo forma, então, um complexo covalente com aduto do inibidor da PLP altamente reativo, uma reação essencialmente irreversível. Dessa maneira, o inibidor faz o próprio mecanismo de ação enzimática matar a enzima.

DFMO mostrou-se altamente eficaz contra a doença do sono em testes clínicos e agora é utilizado para tratar a doença do sono causada por *Trypanosoma brucei gambiense*. Abordagens como essa se revelam muito promissoras para tratar uma vasta gama de doenças. O planejamento de fármacos com base no mecanismo e na estrutura de enzimas pode complementar a metodologia tradicional de tentativa e erro no desenvolvimento de novos agentes farmacêuticos.

(Figura 6-19). Um análogo do estado de transição pode não mimetizar perfeitamente o estado de transição. Alguns análogos, entretanto, ligam-se à enzima-alvo de 10^2 a 10^8 vezes mais fortemente que o substrato normal, fornecendo excelente evidência de que os sítios ativos das enzimas são realmente complementares aos estados de transição. O conceito de análogo ao estado de transição é importante para planejar novos fármacos. Será visto na Seção 6.3 que fármacos anti-HIV poderosos, denominados de inibidores da protease, foram, em parte, planejados como análogos do estado de transição que se ligam fortemente.

RESUMO 6.3 A cinética enzimática como abordagem à compreensão do mecanismo

- A maioria das enzimas tem algumas propriedades cinéticas em comum. Quando o substrato é adicionado a uma enzima, a reação rapidamente atinge um estado estacionário, no qual a velocidade pela qual o complexo ES se forma é compensada pela velocidade pela qual ES se

decompõe. Em concentração fixa de enzima, à medida que a $[S]$ aumenta, a atividade do estado estacionário aumenta de maneira hiperbólica até se aproximar de uma velocidade máxima característica, $V_{\text{máx}}$, na qual, essencialmente, toda a enzima está na forma de um complexo com o substrato.

- A concentração de substrato que leva a uma velocidade de reação igual à metade da $V_{\text{máx}}$ é a constante de Michaelis, K_m , que é característica para cada enzima agindo sobre determinado substrato. A equação de Michaelis-Menten

$$V_0 = \frac{V_{\text{máx}}[S]}{K_m + [S]}$$

relaciona a velocidade inicial com $[S]$ e $V_{\text{máx}}$ por meio da constante K_m . A cinética de Michaelis-Menten também é denominada cinética do estado estacionário.

- K_m e V_m têm significados diferentes para diferentes enzimas. A velocidade limitante de uma reação catalisa-

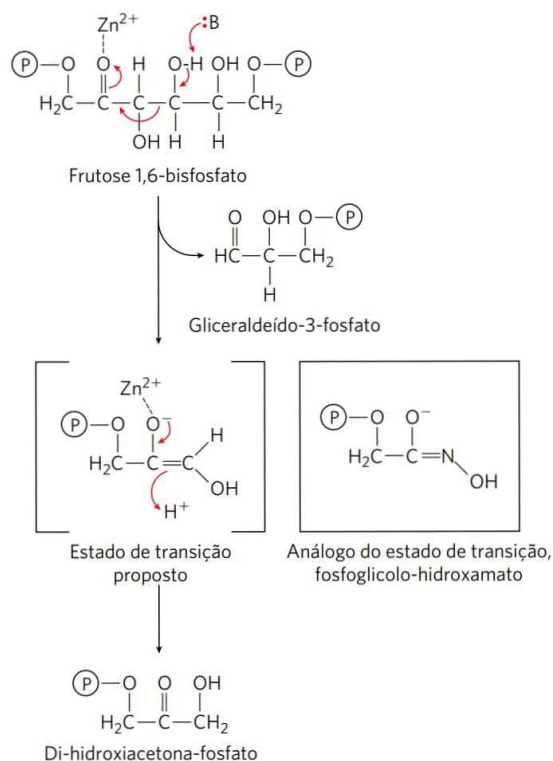


FIGURA 6-19 Análogo do estado de transição. Na glicólise, uma aldolase de classe II (encontrada em bactérias e fungos) catalisa a quebra da frutose-1,6-bisfosfato, formando gliceraldeído-3-fosfato e di-hidroxiacetona-fosfato (ver Figura 14-16 para um exemplo de aldolase de classe I, encontrada em animais e plantas superiores). A reação ocorre via um mecanismo do tipo condensação aldólica reversível. O composto fosfoglicólico-hidroamato, que é semelhante ao enediolato proposto para o estado de transição liga-se à enzima cerca de 10 mil vezes melhor do que o produto (di-hidroacetona-fosfato).

da por uma enzima, quando saturada, é descrita pela constante k_{cat} , o número de renovação. A relação k_{cat}/K_m fornece uma boa medida da eficiência catalítica. A equação de Michaelis-Menten também é aplicável a reações de bissubstrato, nas quais ocorrem etapas com um complexo ternário, ou pingue-pongue (deslocamento duplo).

- Cada enzima tem um pH ótimo (ou um intervalo de pH), no qual a atividade é máxima.
- A cinética do estado pré-estacionário pode dar mais ideias sobre os mecanismos das reações enzimáticas.
- A inibição reversível de uma enzima pode ser competitiva, incompetitiva ou mista. Inibidores competitivos competem com o substrato para se ligarem reversivelmente ao sítio ativo, mas não são transformados pela enzima. Inibidores incompetitivos ligam-se apenas ao complexo ES, em um sítio diferente do sítio ativo. Inibidores mistos ligam-se tanto a E quanto a ES, novamente em um sítio distinto do sítio ativo. Na inibição irreversível, o inibidor liga-se permanentemente ao sítio ativo pela formação de uma ligação covalente ou por uma interação não covalente muito estável.

6.4 Exemplos de reações enzimáticas

Até agora o foco da discussão foi concentrado nos princípios gerais da catálise e na introdução de alguns dos parâmetros cinéticos usados para descrever a ação das enzimas. Agora, a discussão será centrada em alguns exemplos de mecanismos específicos de reações enzimáticas.

Para se chegar a entender o mecanismo completo de ação de uma enzima pura, deve-se identificar todos os substratos, cofatores, produtos e reguladores. Deve-se também conhecer (1) a sequência temporal das reações que levam às formas intermediárias, (2) a estrutura de cada intermediário e do estado de transição, (3) as velocidades da interconversão entre intermediários, (4) as relações estruturais da enzima com cada intermediário e (5) a contribuição energética dada por cada grupo que reage ou interage com os estados complexos intermediários e de transição. São poucas as enzimas para as quais o conhecimento que se tem atualmente preenche todos esses requisitos.

A seguir, serão apresentados os mecanismos de quatro enzimas: quimotripsina, hexocinase, enolase e lisozima. Esses exemplos não pretendem cobrir todas as classes possíveis da química enzimática. Foram escolhidos, em parte, porque estão entre as enzimas sobre as quais mais se conhece e, em parte, porque ilustram com clareza alguns dos princípios gerais resumidos neste capítulo. A discussão se concentrará em princípios selecionados, juntamente com alguns experimentos-chave que contribuíram para estabelecer estes princípios. O exemplo da quimotripsina servirá para revisar a convenção usada para descrever os mecanismos enzimáticos. Obviamente, muitos detalhes dos mecanismos e das evidências experimentais estão omitidos. Apenas um livro não poderia documentar por completo a rica história dos experimentos realizados com essas enzimas. Também, a contribuição especial que as coenzimas dão para a atividade catalítica será abordada brevemente. As funções químicas das coenzimas são variadas e cada coenzima está descrita em detalhes na Parte II.

O mecanismo da quimotripsina envolve a acilação e a desacilação de um resíduo de serina

A quimotripsina pancreática bovina (M_r 25.191) é uma protease, enzima que catalisa a hidrólise de ligações peptídicas. Essa protease é específica para ligações peptídicas adjacentes a resíduos de aminoácidos aromáticos (Trp, Phe, Tyr). A estrutura tridimensional da quimotripsina está mostrada na **Figura 6-20**, enfatizando os grupos funcionais do sítio ativo. A reação catalisada por essa enzima ilustra bem os princípios da estabilização do estado de transição e também é um exemplo clássico de catálise acidobásica e de catálise covalente.

A quimotripsina aumenta a velocidade da hidrólise da ligação peptídica por um fator de no mínimo 10^9 . Ela não catalisa um ataque direto da água à ligação peptídica; em vez disso, forma-se um intermediário acil-enzima covalente e transitório. Assim, a reação tem duas fases distintas. Na fase de acilação, a ligação peptídica é rompida e há a formação de uma ligação éster entre o átomo de carbono da carbonila da ligação peptídica e a enzima. Na fase de desacilação, a ligação éster é hidrolisada e a enzima não acilada é regenerada.

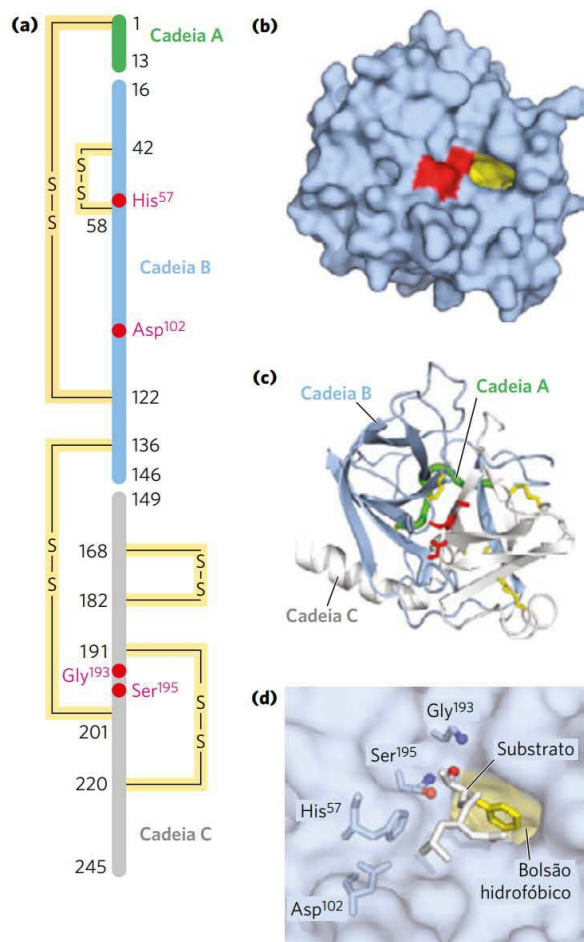


FIGURA 6-20 Estrutura da quimotripsina. (a) Representação da estrutura primária, mostrando as ligações dissulfeto e os resíduos de aminoácidos cruciais para a catálise. A proteína consiste em três cadeias polipeptídicas ligadas por ligações dissulfeto. (A numeração dos resíduos na quimotripsina, com ausência dos resíduos 14, 15, 147 e 148, está explicada na Figura 6-39.) Na estrutura tridimensional, os resíduos de aminoácidos do sítio ativo ficam agrupados. (b) Esquema da superfície da enzima. O bolsão hidrofóbico ao qual as cadeias laterais dos aminoácidos aromáticos do substrato se ligam está mostrado em amarelo. Os resíduos de aminoácidos que são chave para o sítio ativo, incluindo Ser¹⁹⁵, His⁵⁷ e Asp¹⁰², estão em vermelho. Os papéis desses resíduos na catálise estão ilustrados na Figura 6-23. (c) O esqueleto polipeptídico da estrutura está representado na forma de fita. As ligações dissulfeto estão em amarelo; as três cadeias estão coloridas como em (a). (d) Visão ampliada do sítio ativo da enzima com o substrato (branco e amarelo) ligado. A hidroxila da Ser¹⁹⁵ ataca o grupo carbonila do substrato (os oxigênios estão em vermelho) e a carga negativa que se forma no oxigênio é estabilizada pelo bolsão do oxânion (os nitrogênios das amidas da Ser¹⁹⁵ e Gly¹⁹³ estão em azul), como está explicado na Figura 6-23. As cadeias laterais dos aminoácidos aromáticos do substrato (em amarelo) encaixam-se no bolsão hidrofóbico. O nitrogênio da amida da ligação peptídica a ser clivada (protuberante em relação ao observador e projetando-se para o resto da cadeia do substrato polipeptídico) está em branco. [Fonte: (b, c, d) PDB ID 7GCH, K. Brady et al., *Biochemistry* 29:7600, 1990.]

A primeira evidência da existência de um intermediário acil-enzima covalente veio da aplicação clássica da cinética de estado pré-estacionário. Além de agir sobre peptídeos, a quimotripsina também catalisa a hidrólise de pequenos

ésteres e amidas. Essas reações são muito mais lentas do que a hidrólise de peptídeos porque há menos disponibilidade de energia com substratos pequenos (também, o estado pré-estacionário é proporcionalmente mais demorado) e isso simplifica a análise das reações. Investigações realizadas por B. S. Hartley e B. A. Kilby, em 1954, revelaram que a hidrólise do éster *p*-nitrofenilacetato pela tripsina, medida pela liberação de *p*-nitrofenol, ocorre com uma fase de explosão rápida inicial antes de nivelar a uma velocidade menor (**Figura 6-21**). Extrapolando para o tempo zero, conclui-se que a fase de pulso corresponde à liberação de exatamente uma molécula de *p*-nitrofenol por cada molécula de enzima presente (uma pequena porcentagem das moléculas de enzima está inativa). Hartley e Kilby sugeriram que o *p*-nitrofenol aparece durante a acilação rápida de todas as moléculas de enzima, e a velocidade do novo ciclo de catálise é limitada pela etapa de desacilação, que é lenta. Desde então, resultados semelhantes foram encontrados para muitas outras enzimas. A observação da fase de pulso fornece outro exemplo do uso da cinética para separar uma reação em suas etapas constituintes.

Outras características do mecanismo da quimotripsina foram descobertas pela análise da dependência da reação ao pH. A relação entre a velocidade da reação catalisada pela quimotripsina e a variação do pH mostra um perfil em forma de sino (**Figura 6-22**). As velocidades mostradas no gráfi-

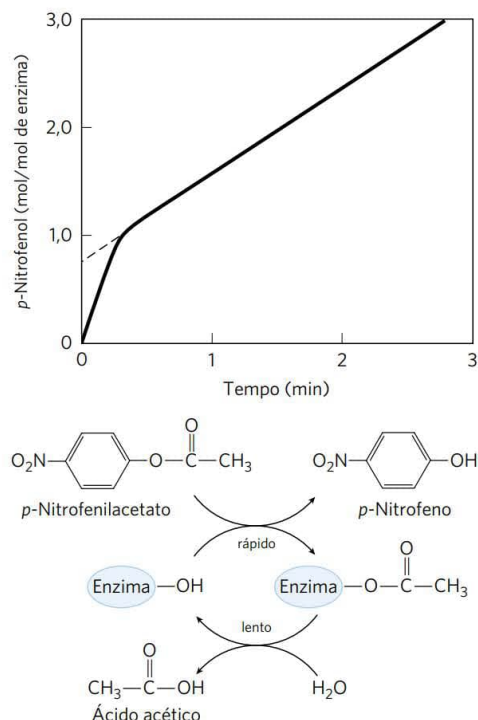


FIGURA 6-21 Evidência de um intermediário acil-enzima fornecida pela cinética do estado pré-estacionário. A hidrólise de *p*-nitrofenilacetato pela quimotripsina é medida pela liberação de *p*-nitrofenol (um produto colorido). Inicialmente, a reação libera *p*-nitrofenol de maneira muito rápida e próxima da estequiometria com a quantidade da enzima presente. Isso reflete a rápida fase de acilação da enzima. A velocidade subsequente é menor porque a renovação da enzima é limitada pela baixa velocidade da fase de desacilação.

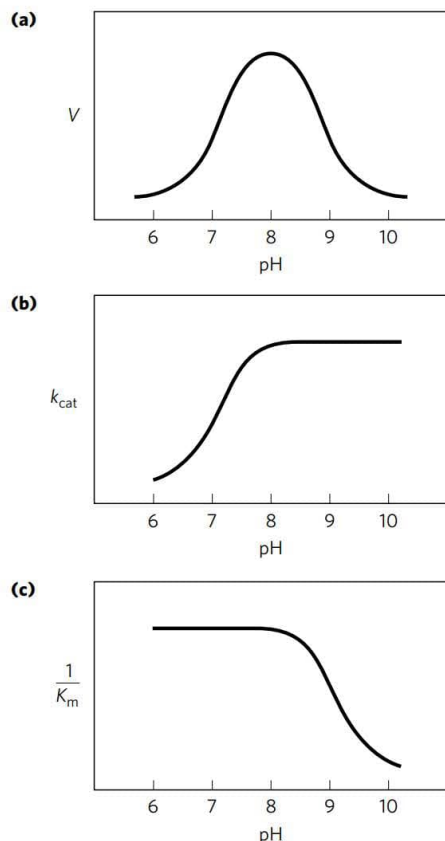


FIGURA 6-22 A dependência de pH da reação catalisada pela quimotripsina. (a) As relações entre velocidades da clivagem catalisada pela quimotripsina e o pH produzem uma curva de velocidade com um perfil na forma de sino e com um pH ótimo de 8,0. A velocidade (V) colocada no gráfico corresponde a uma baixa concentração de substrato e, portanto, reflete o termo k_{cat}/K_m . O gráfico pode ser desmembrado nos seus componentes usando métodos cinéticos para definir os termos k_{cat} e K_m separadamente em cada pH. Quando isso é feito (b, c), fica claro que a transição logo acima de pH 7,0 deve-se a mudanças no k_{cat} , ao passo que a transição acima de pH 8,5 deve-se a mudanças em $1/K_m$. Estudos cinéticos e estruturais mostram que as transições ilustradas em (b) e (c) refletem os estados de ionização da cadeia lateral da His⁵⁷ (quando o substrato não está ligado) e do grupo α -amino da Ile¹⁶ (o grupo aminoterminal da cadeia B), respectivamente. Para uma atividade ótima a His⁵⁷ deve estar desprotonada e a Ile¹⁶ deve estar protonada.

co da Figura 6-22a são obtidas em baixas (subsaturantes) concentrações de substrato e, portanto, representam k_{cat}/K_m (ver Equação 6-27, p. 203). Uma análise mais completa das velocidades em diferentes concentrações de substrato em cada pH permite que o pesquisador determine a contribuição individual dos termos k_{cat} e K_m (Figura 6-21b). Depois de obter o valor da velocidade máxima em cada pH, pode-se fazer um gráfico de apenas k_{cat} versus pH (Figura 6-22b). Depois de obter a K_m em cada pH, os pesquisadores podem fazer um gráfico $1/K_m$ versus pH (Figura 6-22c). Análises cinéticas e estruturais revelaram que as mudanças na k_{cat} que ocorre em pH baixo é resultado da protonação da His⁵⁷ (assim, ela não pode tirar um próton da Ser¹⁹⁵ na etapa 2 da reação; ver Figura 6-23). Essa redução na velocidade ilustra a importância da catálise geral acidobásica

no mecanismo da quimotripsina. As mudanças no termo $1/K_m$ refletem a ionização do grupo α -amino da Ile¹⁶ (situado na extremidade aminoterminal de uma das três cadeias polipeptídicas da enzima). Esse grupo forma uma ponte salina com o Asp¹⁹⁴ e isso estabiliza a conformação ativa da enzima. Quando esse grupo perde seu próton em pH alto, a ponte salina é eliminada e a mudança conformacional fecha o bolsão hidrofóbico onde a cadeia lateral do aminoácido aromático do substrato se encaixa (Figura 6-20). Os substratos já não podem mais se ligar de modo apropriado, o que é medido cineticamente pelo aumento na K_m .

Pode-se ver, na Figura 6-23, que o nucleófilo da fase de acilação é o oxigênio da Ser¹⁹⁵. (Proteases com um resíduo de serina desempenhando esse papel no mecanismo de reação são denominadas **serino-proteases**.) O pK_a do grupo hidroxila da Ser geralmente é alto demais para que, em pH fisiológico, a forma não protonada esteja presente em concentrações significativas. Entretanto, na quimotripsina, a Ser¹⁹⁵ está associada a His⁵⁷ e Asp¹⁰² por meio de uma rede de ligações de hidrogênio, conhecida como **triade catalítica**. Quando um substrato peptídico se liga à quimotripsina, uma mudança sutil na conformação comprime a ligação de hidrogênio entre His⁵⁷ e Asp¹⁰², o que resulta em uma interação mais forte, denominada ligação de hidrogênio de baixa barreira. Essa interação mais forte aumenta o pK_a da His⁵⁷ de cerca de 7 (no caso da histidina livre) para > 12 , possibilitando que o resíduo de His atue como uma base geral mais forte que pode remover o próton do grupo hidroxila da Ser¹⁹⁵. A desprotonação evita o aparecimento de uma carga positiva muito instável na hidroxila da Ser¹⁹⁵ e torna a cadeia lateral da Ser um nucleófilo forte. Nos estágios finais da reação, a His⁵⁷ também age como um doador de próton, protonando o grupo amino que é liberado (o grupo de saída) do substrato.

À medida que o oxigênio da Ser¹⁹⁵ ataca o grupo carbonila do substrato (Figura 6-23, etapa 2) há a formação de um intermediário tetraédrico de vida curta, no qual o oxigênio da carbonila adquire uma carga negativa. Essa carga, formada no interior de um bolsão da enzima, denominado bolsão do oxianion, é estabilizada pelas ligações de hidrogênio formadas pelos grupos amida de duas ligações peptídicas do esqueleto de carbono da quimotripsina. Uma dessas ligações de hidrogênio (formada pela Gly¹⁹³) está presente apenas nesse intermediário e no estado de transição que leva a sua formação e quebra. Ela reduz a energia necessária para atingir esses estágios. Esse é um exemplo do uso de energia de ligação na catálise por meio da complementariedade a um estado de transição.

O conhecimento do mecanismo das proteases levou a novos tratamentos para infecções por HIV



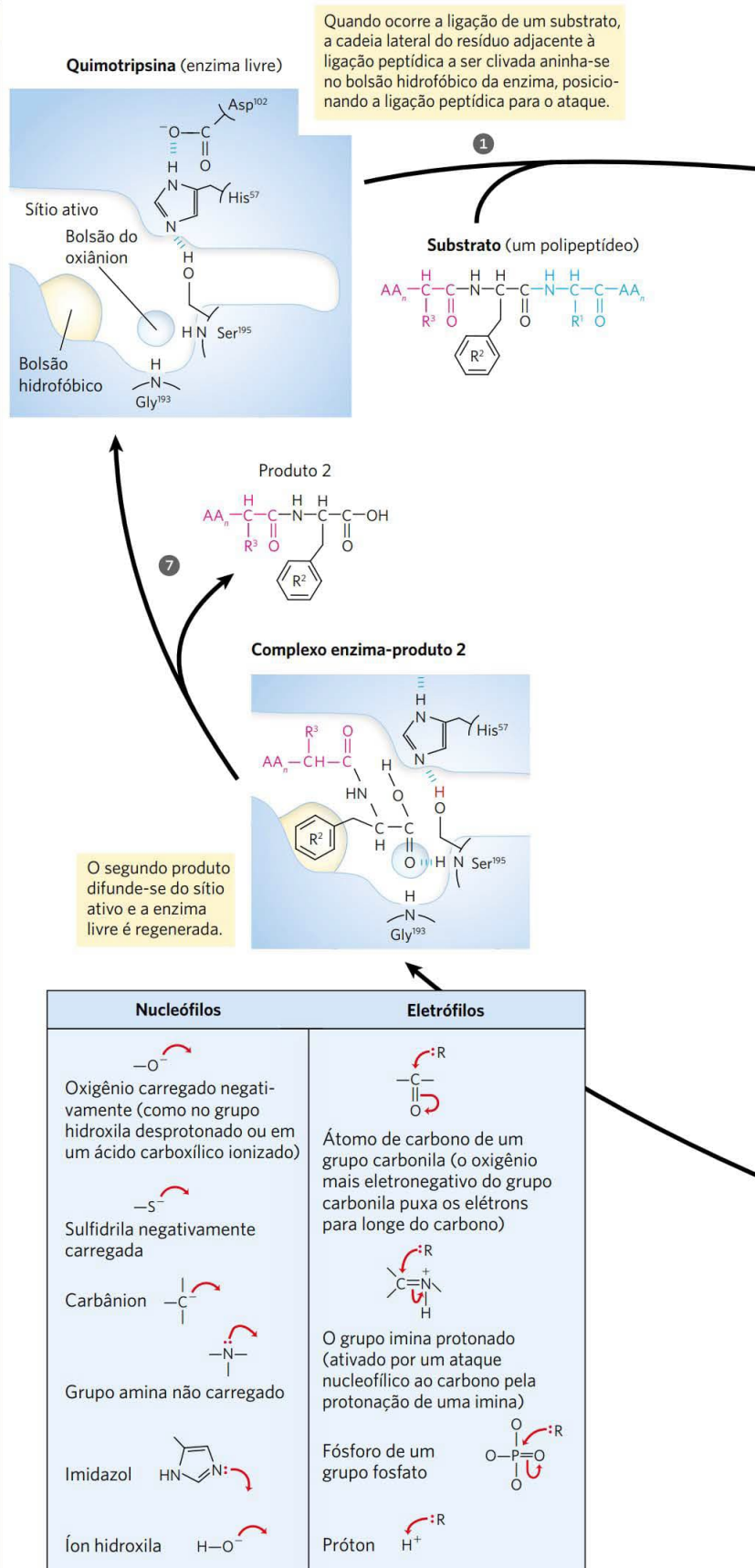
Quase sempre os novos agentes farmacêuticos são feitos para inibir alguma enzima. O grande sucesso de terapias desenvolvidas para tratar infecções por HIV é uma evidência disso. O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é o agente que causa a síndrome da imunodeficiência adquirida (Aids). Estima-se que, em 2015, o número de pessoas infectadas com HIV no mundo todo era de cerca de 20 a 41 milhões com 2 milhões de novos casos naquele ano e 1,2 milhão de mortes. A Aids apareceu como uma epidemia mundial na década de 1980 e o HIV foi descoberto logo em

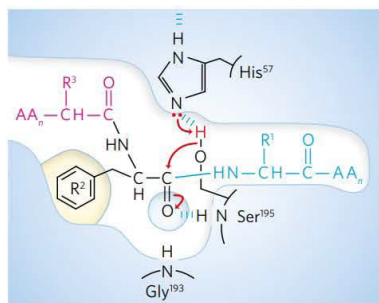
Lembrando: como ler os mecanismos de reação

Os mecanismos das reações químicas, que determinam a formação e a quebra de ligações covalentes, são mostrados por meio de pontos e flechas curvas, convenção conhecida informalmente como “deslocamento de elétrons”. Elétrons que não participam de ligações e que são importantes para o mecanismo de reação são representados por pontos (•OH). Flechas curvas (↷) representam o movimento de um par de elétrons. Para representar o movimento de um único elétron se usa uma flecha com uma única cabeça (tipo anzol) (↘). A maioria das etapas das reações envolvem um par de elétrons não compartilhado (como no mecanismo da quimotripsina).

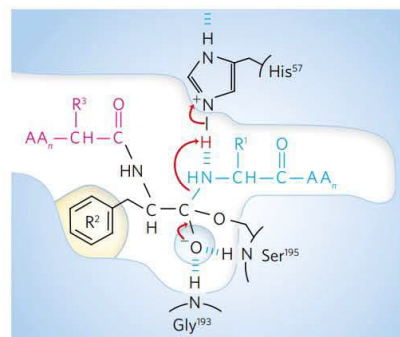
Alguns átomos são mais eletronegativos do que outros, isto é, eles atraem elétrons com mais intensidade. As eletronegatividades dos átomos encontrados nesse livro são $F > O > N > C \approx S > P \approx H$. Por exemplo, os dois pares de elétrons que formam a ligação C=O (carbonila) não são compartilhados equitativamente. O carbono é relativamente deficiente em elétrons e o oxigênio atrai os elétrons. Muitas reações envolvem a reação entre um átomo rico em elétrons (um átomo nucleofílico) e um átomo rico em elétrons (um átomo eletrofílico). Alguns dos nucleófilos e eletrófilos mais comuns em bioquímica estão mostrados à direita.

Geralmente, um mecanismo de reação inicia em um par de elétrons não pareados de um nucleófilo. Nos diagramas de mecanismos a flecha inicia perto dos pontos que representam um par de elétrons e a ponta da flecha mostra o centro eletrofílico que é atacado. Enquanto o par de elétrons não compartilhado confere uma carga negativa formal no nucleófilo, o símbolo de carga negativa pode representar o par de elétrons não pareados e é a base da flecha. No mecanismo da quimotripsina, o par de elétrons nucleofílicos no complexo ES entre as etapas 1 e 2 é fornecido pelo oxigênio do grupo hidroxila da Ser¹⁹⁵. O início da flecha é esse par de elétrons (2 dos 8 elétrons da valência do oxigênio hidroxílico). O centro eletrofílico sob ataque é o carbono da carbonila da ligação peptídica a ser clivada. Os átomos de C, O e N têm uma valência máxima de 8 elétrons e o H tem um máximo de 2. Ocasionalmente, esses elétrons são encontrados em estados instáveis com menos do que o máximo possível de elétrons mas C, O e N nunca podem ter mais do que 8. Desse modo, quando o par de elétrons da Ser¹⁹⁵ da quimotripsina ataca o carbono carbonílico do substrato um par de elétrons é deslocado da camada de valência do carbono (não é possível haver um carbono com cinco ligações!). Esses elétrons movem-se na direção do oxigênio da carbonila que é mais eletronegativo. O oxigênio tem 8 elétrons de valência tanto antes como depois desse processo químico, mas o número de elétrons compartilhado com o carbono é reduzido de 4 para 2 e o oxigênio da carbonila adquire uma carga negativa. Na etapa seguinte, o par de elétrons que confere a carga negativa do oxigênio retorna para formar novamente uma ligação com o carbono e restabelece a ligação carbonílica. Novamente, um par de elétrons deve ser deslocado do carbono e desta vez é o par de elétrons compartilhado como o grupo amino da ligação peptídica. Isso quebra a ligação peptídica. As etapas restantes seguem um padrão semelhante.



Complexo ES

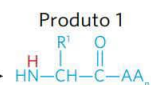
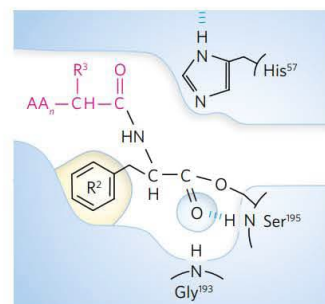
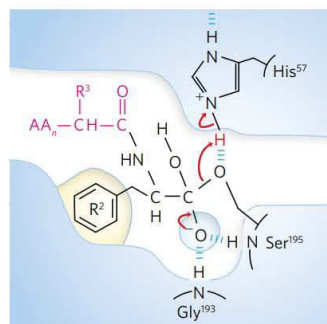
A interação entre a Ser¹⁹⁵ e a His⁵⁷ origina um íon alcóxido fortemente nucleofílico na Ser¹⁹⁵; o íon ataca o grupo carbonila peptídico, formando uma acil-enzima tetraédrica. Isso é acompanhado pela formação de uma carga negativa de vida curta no oxigênio da carbonila do substrato, que é estabilizado pela ligação de hidrogênio no bolsão do oxânion.

Intermediário* de vida curta (acilação)

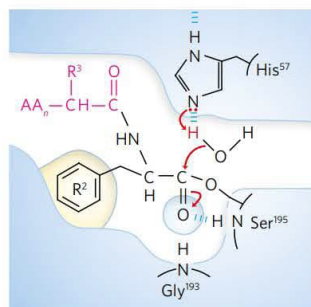
A instabilidade da carga negativa no oxigênio da carbonila do substrato leva ao colapso do intermediário tetraédrico; a formação novamente de ligação dupla com o carbono desloca a ligação entre o carbono e o grupo amino da ligação peptídica. O grupo amino de saída é protonado pela His⁵⁷, facilitando o seu deslocamento.

MECANISMO-FIGURA 6-23 Hidrólise de uma ligação peptídica pela quimotripsina. A reação tem duas fases. Na fase de acilação (etapas 1 a 4), a formação de um intermediário covalente acil-enzima é acoplada à clivagem da ligação peptídica. Na fase de desacilação (etapas 5 a 7), a desacilação regenera a enzima livre. Isso é essencialmente o reverso da fase de acilação, com a água tendo, no sentido oposto, o papel do componente amina do substrato.

*O intermediário tetraédrico de vida curta que é formado na etapa 2 e o segundo intermediário tetraédrico que se forma depois são, algumas vezes, chamados de estados de transição. Entretanto, essa terminologia pode causar confusão. Um *intermediário* é qualquer espécie química com um tempo de vida finito, "tempo de vida" sendo definido como um tempo maior do que o tempo da vibração molecular (cerca de 10^{-13} segundos). Um *estado de transição* é simplesmente a espécie de maior energia formada durante a coordenada da reação, não tendo um tempo de vida finito. Os intermediários tetraédricos formados na reação da quimotripsina lembram perfeitamente, tanto energética como estruturalmente, os estados de transição que levam à sua formação e ao rompimento. Entretanto, o intermediário representa um estágio de comprometimento com a formação da ligação, ao passo que o estado de transição é parte do processo da reação. No caso da quimotripsina, devido à estreita relação entre o intermediário e o verdadeiro estado de transição, a diferenciação entre eles normalmente é desconsiderada. Além disso, a interação do oxigênio negativamente carregado com os nitrogênios da amida no bolsão do oxânion, geralmente considerado como estabilização do estado de transição, também serve para estabilizar o intermediário. Nem todos os intermediários têm uma vida tão curta para parecer um estado de transição. O intermediário acil-enzima da quimotripsina é muito mais estável e mais facilmente detectado e estudado, não deve ser confundido com o estado de transição.

**Intermediário acil-enzima****Intermediário* de vida curta (desacilação)**

O colapso do intermediário tetraédrico forma o segundo produto, um ânion carboxilato, e desloca a Ser¹⁹⁵.

Intermediário acil-enzima

A molécula de água que entra é desprotonada por catálise básica geral, gerando um íon hidróxido fortemente nucleofílico. O ataque do hidróxido à ligação éster da acil-enzima gera um segundo intermediário tetraédrico, e o oxigênio no bolsão do oxânion novamente adquire uma carga negativa.

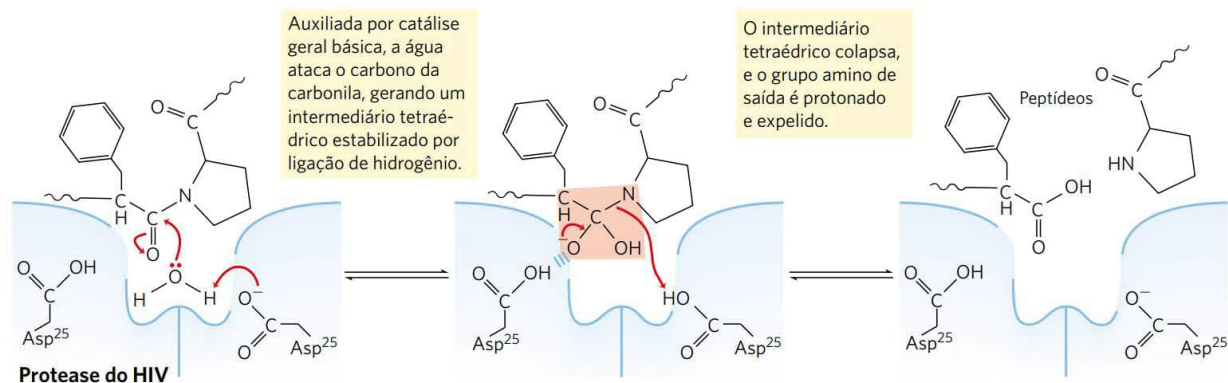


FIGURA 6-24 Mecanismo de ação da protease do HIV. Dois resíduos de Asp do sítio ativo (de diferentes subunidades) agem como catalisador geral acidobásico, facilitando o ataque da água sobre a ligação peptídica. O intermediário tetraédrico instável formado no curso da reação está sombreado em cor salmão.

seguida e identificado como um **retrovírus**. Os retrovírus possuem um genoma de RNA e uma enzima, transcriptase reversa, que utiliza diretamente RNA para fazer a síntese de um DNA complementar. Os esforços para entender o HIV e desenvolver terapias para a sua infecção se beneficiaram de décadas de pesquisa básica, tanto sobre mecanismos de enzimas quanto sobre as propriedades de outros retrovírus.

Um retrovírus como o HIV tem um ciclo de vida relativamente simples (ver Figura 26-32). O seu genoma de RNA é convertido em dupla-fita de DNA em várias etapas catalisadas pela transcriptase reversa (descrita no Capítulo 26). A dupla-fita de DNA é inserida em um dos cromossomos do núcleo da célula hospedeira por uma enzima, a integrase (descrita no Capítulo 25). A cópia do genoma viral integrada no cromossomo pode ficar indefinidamente silenciosa. De modo alternativo, ela pode ser transcrita novamente em RNA, o qual pode, então, ser traduzido em proteínas para formar novas partículas virais. A maior parte dos genes de vírus é traduzida em grandes poliproteínas que são quebradas pela protease do vírus nas proteínas individuais necessárias para formar o vírus (ver Figura 26-33). São apenas três as enzimas-chave que operam este ciclo, a transcriptase reversa, a integrase e a protease. Essas enzimas são, portanto, os alvos de fármacos mais promissores.

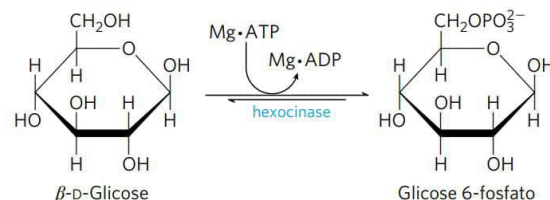
Existem quatro subclasses principais de proteases. As serina-proteases, como a quimotripsina e a tripsina, e as cisteína-proteases (possuem no sítio ativo um resíduo de Cys que tem um papel catalítico semelhante ao da Ser) formam complexos enzima-substrato covalentes, ao passo que as aspartato-proteases e as metaloproteases, não. A protease do HIV é uma aspartato-protease. Dois resíduos de Asp do sítio ativo facilitam o ataque direto de uma molécula de água ao grupo carbonila da ligação peptídica a ser clivada (**Figura 6-24**). O produto inicial desse ataque é um intermediário tetraédrico parecido com aquele da reação da quimotripsina. Esse intermediário se assemelha em estrutura e energia ao estado de transição da reação. Os fármacos que foram desenvolvidos como inibidores da protease do HIV formam complexos não covalentes com a enzima, mas eles se ligam à enzima tão fortemente que podem ser considerados como inibidores irreversíveis. Essa ligação tão forte deriva, em parte, da estrutura que foi planejada para ser análoga ao estado de transição. O sucesso desses fárma-

cos traz uma questão que deve ser enfatizada: os princípios da catálise estudados neste capítulo não são simplesmente ideias vagas que devem ser decoradas, mas a aplicação desses princípios salva vidas.

A protease do HIV é mais eficiente para clivar ligações peptídicas entre resíduos de Phe e Pro. O sítio ativo tem um bolsão que liga um grupo aromático próximo à ligação que será clivada. Alguns dos inibidores da protease do HIV estão mostrados na **Figura 6-25**. Embora pareça que há grande variação entre as estruturas, todas elas possuem uma estrutura central comum; uma cadeia com um grupo hidroxila posicionado próximo a uma ramificação contendo um grupo benzila. Essa organização direciona o grupo benzila ao bolsão de ligação aromático (hidrofóbico). O grupo hidroxila adjacente mimetiza o oxigênio negativamente carregado do intermediário tetraédrico da reação normal, fornecendo um análogo do estado de transição. O restante da estrutura de cada inibidor foi planejado para se ligar a várias cavidades ao longo da enzima, reforçando a ligação total. A disponibilidade desses fármacos eficazes aumentou enormemente o tempo e a qualidade de vida de milhões de pessoas com HIV e Aids. No início de 2015, cerca de 15 milhões dos aproximadamente 37 milhões de pessoas infectadas com HIV estavam recebendo terapia antiviral. ■

A hexocinase sofre um ajuste induzido quando o substrato se liga

A hexocinase de levedura (M_r 107.862) é uma enzima bis-substrato que catalisa a reação reversível



ATP e ADP sempre se ligam às enzimas em complexo com o íon metálico Mg^{2+} .

Na reação da hexocinase, o γ -fosforila do ATP é transferido para a hidroxila do C-6 da glicose. Essa hidroxila

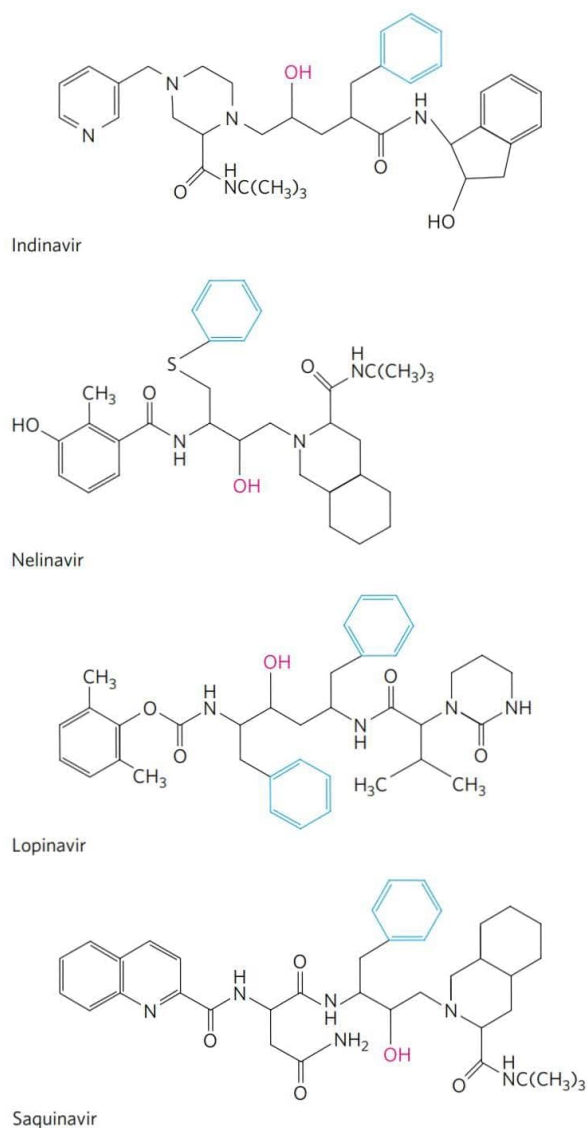


FIGURA 6-25 Inibidores da protease do HIV. O grupo hidroxila (em vermelho) age como análogo do estado de transição, mimetizando o intermediário tetraédrico. O grupo benzila adjacente (em azul) ajuda a posicionar o fármaco apropriadamente.

tem uma reatividade semelhante à da água, a qual pode entrar livremente no sítio ativo da enzima. Assim, a hexocinase favorece a reação com a glicose por um fator de 10^6 . A enzima consegue diferenciar as moléculas de glicose e de água devido a uma mudança conformacional na enzima que ocorre quando o substrato correto se liga ao sítio ativo (**Figura 6-26**). Portanto, a hexocinase é um bom exemplo de ajuste induzido. Na ausência de glicose, a enzima fica na conformação inativa, com as cadeias laterais dos aminoácidos do sítio ativo fora de posição para a reação. Quando glicose (mas não água) e $Mg \cdot ATP$ se ligam, a energia de ligação decorrente dessa interação induz mudança na conformação da hexocinase para a forma cataliticamente ativa.

Esse modelo foi corroborado por estudos cinéticos. O açúcar de cinco carbonos xilose, estereoquimicamente

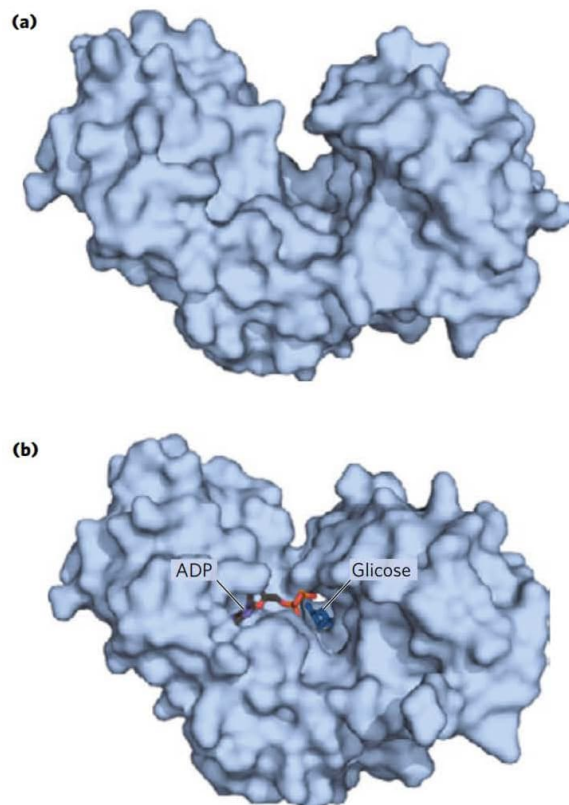
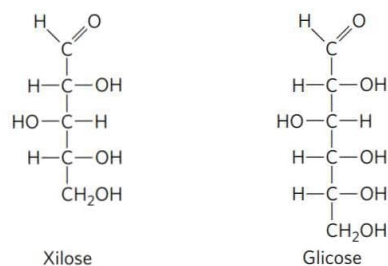


FIGURA 6-26 Ajuste induzido da hexocinase. (a) A hexocinase tem uma estrutura em forma de U. (b) As extremidades juntam-se uma à outra quando a conformação se altera devido à indução por D-glicose. [Fontes: (a) PDB ID 2YHX, C. M. Anderson et al., *J. Mol. Biol.* 123:15, 1978. (b) PDB ID 2E2O, modelado com ADP ligado, obtido a partir de PDB ID 2E2Q, H. Nishimasu, et al., *J. Biol. Chem.* 282:9923, 2007.]

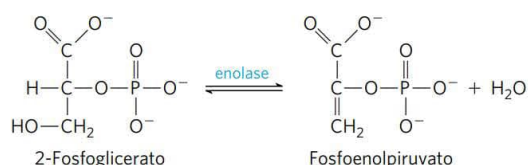
similar à glicose, mas com um carbono a menos, liga-se à hexocinase, embora em uma posição na qual não possa ser fosforilado. Apesar disso, a adição de xilose à mistura de reação aumenta a velocidade da hidrólise de ATP. Evidentemente, a ligação da xilose é suficiente para induzir uma mudança na hexocinase para a conformação ativa, e a enzima é “enganada” para fosforilar água. A reação da hexocinase também ilustra que a especificidade da enzima nem sempre é uma simples questão de ligar um composto e não outro. No caso da hexocinase, a especificidade que se observa não é na formação do complexo ES, mas nas velocidades relativas das etapas seguintes da catálise. A velocidade da reação aumenta enormemente na presença do substrato glicose, que é capaz de aceitar um grupo fosforila.



O ajuste induzido é apenas um aspecto do mecanismo da hexocinase. Assim como a quimotripsina, a hexocinase utiliza várias estratégias catalíticas. Por exemplo, os resíduos de aminoácidos do sítio ativo (aqueles trazidos para a posição correta na mudança conformacional decorrente da ligação do substrato) participam de catálise geral acidobásica e da estabilização do estado de transição.

O mecanismo de reação da enolase requer a presença de íons metálicos

Outra enzima glicolítica, a enolase, catalisa a desidratação reversível de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato:

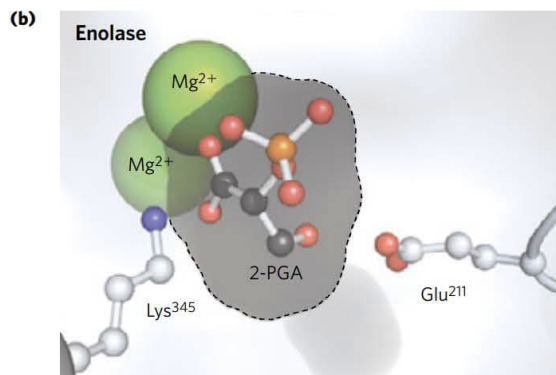
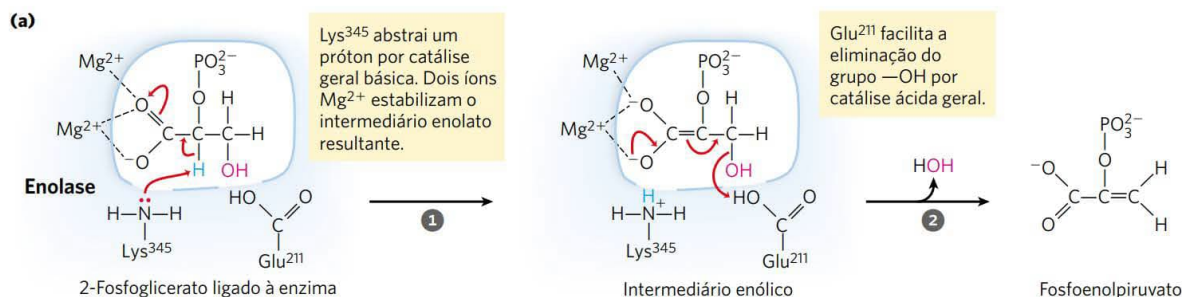


Essa reação serve de exemplo do uso de um cofator enzimático, neste caso um íon metálico (um exemplo da função coenzima foi dado no Quadro 6-3). A enolase de levedura (M_r 93.316) é um dímero com 436 resíduos de aminoácidos em cada subunidade. A reação da enolase ilustra um tipo de catálise por íon metálico e serve de exemplo de catálise geral acidobásica e de estabilização do estado de transição. A reação ocorre em duas etapas (**Figura 6-27a**). Primeiro, a Lys³⁴⁵ age como catalisador geral acidobásico, tirando um próton do C-2 do 2-fosfoglicerato. Então, o Glu²¹¹ age como um catalisador geral acidobásico, doando um próton para o grupo de saída —OH. O próton do C-2 do fosfoglicerato não é muito ácido e, portanto, não pode ser removido

facilmente. Contudo, os átomos de oxigênio (eletronegativos) do grupo carbonila adjacente puxam elétrons do C-2, fazendo os prótons ligados serem um pouco mais lábeis. No sítio ativo, o 2-fosfoglicerato sofre interações iônicas fortes com dois íons Mg^{2+} que estão ligados (**Figura 6-26b**), aumentando fortemente a retirada de elétrons pela carbonila. O conjunto desses efeitos faz os prótons do C-2 ficarem suficientemente ácidos (diminuindo o K_a) de modo que um próton pode ser abstraído para iniciar a reação. À medida que o intermediário enolato instável se forma, os íons metálicos agem como um escudo que protege as duas cargas negativas (nos átomos de oxigênio da carbonila) que existem transitoriamente e muito próximas entre si. Ligações de hidrogênio com outros resíduos de aminoácidos do sítio ativo também contribuem para o mecanismo como um todo. As várias interações estabilizam efetivamente tanto o intermediário enolato quanto o estado de transição que antecede a sua formação.

A lisozima utiliza duas reações sucessivas de deslocamento nucleofílico

A lisozima é um agente antibacteriano natural encontrado em lágrimas e na clara de ovo. A lisozima da clara de ovo (M_r 14.296) é um monômero com 129 resíduos de aminoácidos. Foi a primeira enzima a ter a estrutura tridimensional determinada, por David Phillips e colaboradores em 1965. A estrutura revelou a existência de quatro ligações dissulfeto estabilizadoras e uma fenda contendo o sítio ativo (**Figura 6-28a**). Mais de cinco décadas de investigações permitiram chegar a um quadro detalhado da estrutura e da atividade dessa enzima e contam uma história interessante de como a ciência da bioquímica progride.



MECANISMO-FIGURA 6-27 Reação de duas etapas catalisada pela enolase. (a) O mecanismo pelo qual a enolase converte 2-fosfoglicerato (2-PGA) em fosfoenolpiruvato. O grupo carboxila do 2-PGA é coordenado no sítio ativo por dois íons magnésio. (b) A posição do substrato, 2-PGA, em relação a Mg^{2+} , Lys³⁴⁵ e Glu²¹¹ no centro ativo da enolase (mostrado em cinza). O nitrogênio está mostrado em azul, o fósforo em cor de laranja e os átomos de hidrogênio não são mostrados. [Fonte: (b) PDB ID 1ONE, T. M. Larsen et al., *Biochemistry* 35:4349, 1996.]

O substrato da lisozima é um peptidoglicano, um carboidrato encontrado na parede celular de muitas bactérias. A lisozima cliva a ligação glicosídica C—O ($\beta 1 \rightarrow 4$) (p. 258) entre dois tipos de resíduos de açúcar da molécula, ácido *N*-acetilmurâmico (Mur2Ac) e *N*-acetilglicosamina (GlcNAc) (Figura 6-28b), geralmente, na literatura da pesquisa em enzimologia, abreviados como NAM e NAG, respectivamente. Seis resíduos do peptidoglicano onde Mur2Ac e GlcNAc se alternam ligam-se no sítio ativo em sítios de ligação marcados de A a F. Foram feitos modelos que mostram que a cadeia lateral lactila do Mur2Ac não

consegue se acomodar nos sítios C e E, o que restringe a ligação de Mur2Ac apenas aos sítios B, D e F. Somente uma das ligações glicosídicas é clivada, a ligação entre o resíduo de Mur2Ac no sítio D e o resíduo de GlcNAc no sítio E. Os resíduos-chave de aminoácidos no sítio ativo são Glu³⁵ e Asp⁵² (Figura 6-29a). A reação consiste em uma substituição nucleofílica, com o —OH da água substituindo a GlcNAc no C-1 do Mur2Ac.

A identificação dos resíduos do sítio ativo e a disponibilidade do conhecimento da estrutura da enzima permitiram entender as etapas do mecanismo de reação na década de

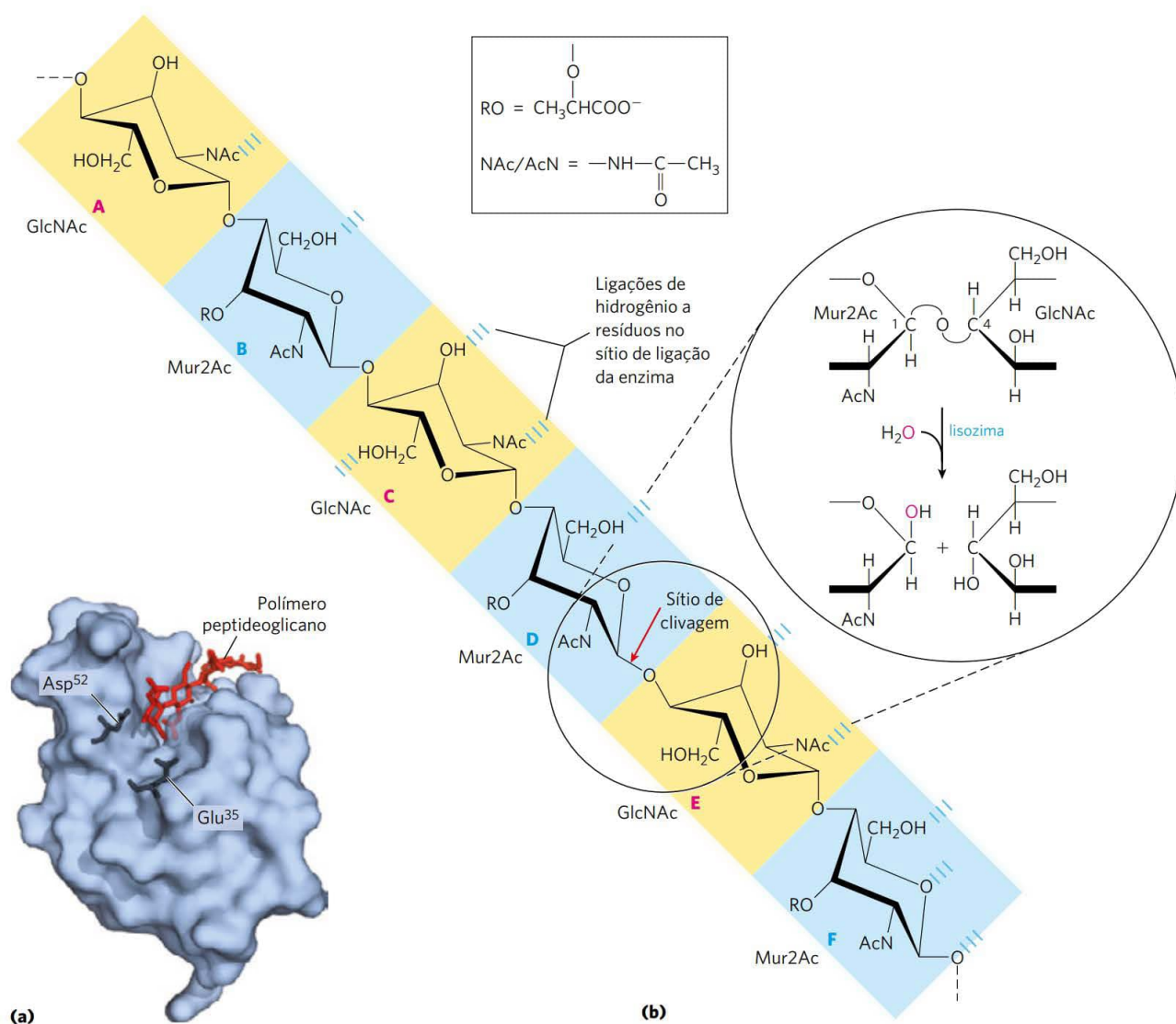
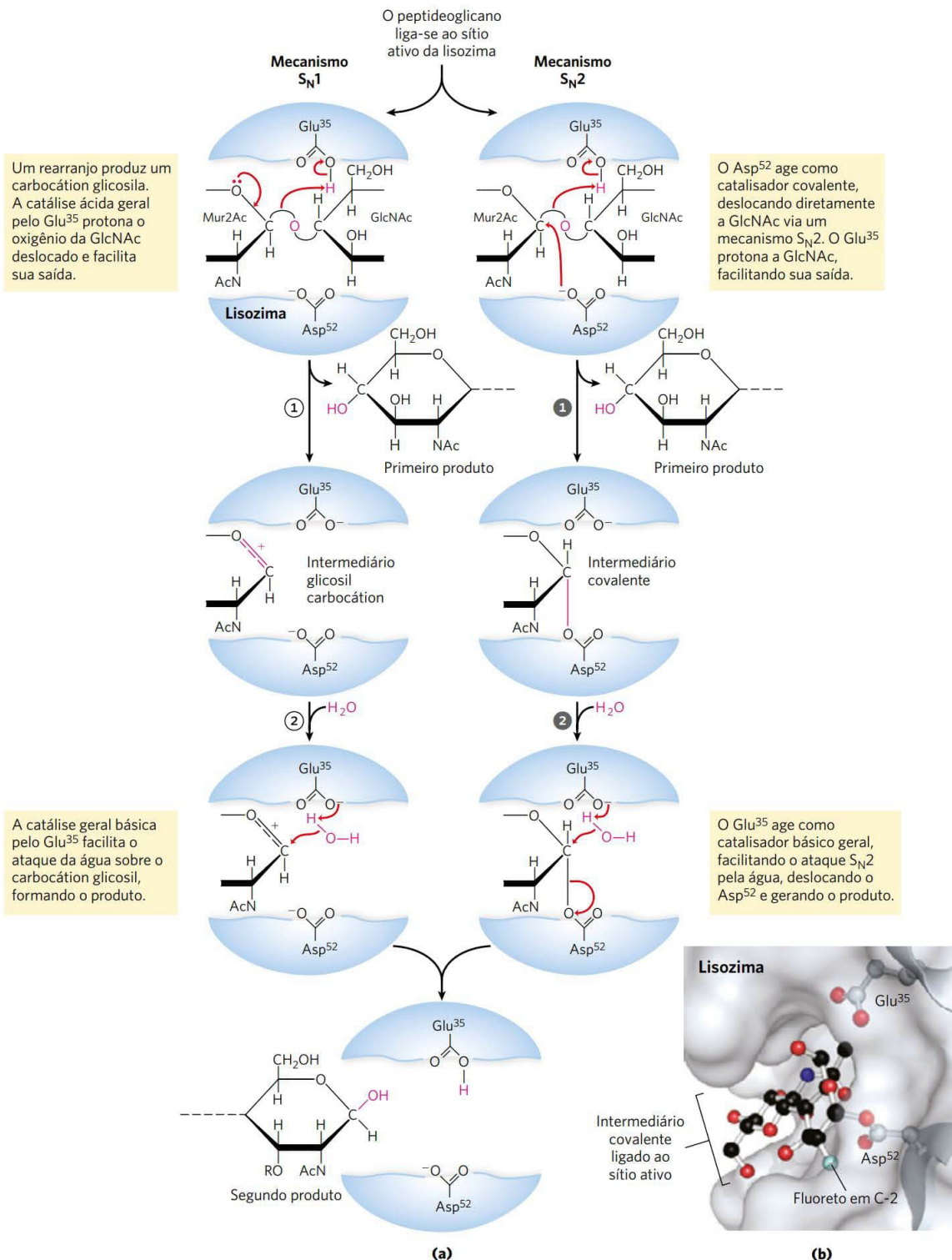


FIGURA 6-28 Lisozima da clara de ovo e a reação que ela catalisa. (a) Representação da superfície da enzima com os resíduos do sítio ativo (Glu³⁵ e Asp⁵²) mostrados como estruturas em bastão pretas e o substrato que está ligado como um bastão vermelho). Observe que a enzima cristalizada era um mutante com Gln substituindo o Glu³⁵ (ver p. 223); a marcação aqui corresponde ao resíduo do tipo selvagem. (b) Reação catalisada pela lisozima da clara de ovo. Um segmento do polímero peptidoglicano é mostrado, com os sítios de ligação de A a F sombreados. A ligação hidrolisada é a ligação glicosídica C—O entre os resíduos de açúcar ligados aos sítios D e E, indicados pela seta vermelha. O inserto mostra a reação de hidrólise com o destino do oxigênio da H₂O marcado em vermelho. Mur2Ac é o ácido *N*-acetilmurâmico, GlcNAc, *N*-acetilglicosamina. RO— representa a cadeia lateral lactil (ácido láctico); —Nac e AcN—, um grupo *N*-acetila (ver a chave). [Fonte: (a) PDB ID 1LZE, K. Maenaka et al., *J. Mol. Biol.* 247:281, 1995.]



MECANISMO-FIGURA 6-29 Reação da lisozima. Nesta reação (descrita no texto), a água é introduzida no produto pelo C-1 do Mur2Ac na mesma configuração que a ligação glicosídica original. A reação é, portanto, uma substituição molecular com retenção da configuração. **(a)** Duas vias propostas que potencialmente explicam a reação total e as suas propriedades. A via S_N1 (à esquerda) é o mecanismo original de Phillips. A via S_N2 (à direita) é o mecanismo mais consistente com os dados mais recentes. **(b)** Representação da superfície do sítio ativo da lisozima, com o intermediário covalente enzima-substrato mostrado como estruturas em esfera e bastão. (Um substrato com fluoreto substituído foi usado no experimento; ver p. 223.) As cadeias laterais dos resíduos do sítio ativo estão mostradas segundo o modelo esfera-bastão. [Fonte: (b) PDB ID 1H6M, D. J. Vocadlo et al., *Nature* 412:835, 2001.]

1960. Entretanto, evidências definitivas para concluir sobre qual seria o mecanismo exato escaparam à percepção dos investigadores por quase quatro décadas. Existem dois mecanismos quimicamente razoáveis que podem gerar o produto que se observa quando a lisozima cliva a ligação glicosídica. Phillips e colaboradores propuseram um mecanismo de dissociação do tipo S_N1 (Figura 6-29a, à esquerda), no qual a GlcNAc inicialmente se dissocia na etapa ①, deixando para trás como intermediário um cátion (um carbocátion) glicosila. Nesse mecanismo, o grupo de saída GlcNAc é protonado por catálise geral ácida pelo Glu³⁵, localizado no bolsão hidrofóbico que dá ao seu grupo carboxílico um pK_a surpreendentemente alto. O carbocátion é estabilizado por ressonância envolvendo o oxigênio do anel adjacente, assim como interações eletrostáticas com a carga negativa do Asp⁵² que está próximo. Na etapa ②, a água ataca o C-1 do Mur2Ac, liberando o produto. O mecanismo alternativo (Figura 6-29a, à direita) envolve duas etapas consecutivas de deslocamentos diretos do tipo S_N2 . Na etapa ①, o Asp⁵² ataca o C-1 do Mur2Ac, deslocando GlcNAc. Do mesmo modo que no primeiro mecanismo, o Glu³⁵ age como um ácido geral, protonando o grupo de saída GlcNAc. Na etapa ②, a água ataca o C-1 do Mur2Ac para deslocar o Asp⁵², gerando o produto.

O mecanismo de Phillips (S_N1) foi amplamente aceito por mais de três décadas. Entretanto, certo grau de controvérsia persistiu e os testes continuaram. Algumas vezes, o método científico avança lentamente, sendo difícil planejar experimentos que mostrem uma resposta definitiva. Alguns dos primeiros argumentos contra o mecanismo de Phillips eram sugestivos, mas não completamente persuasivos. Por exemplo, a meia-vida do cátion glicosila proposto era estimada em 10^{-12} segundos, apenas um pouco maior que a vibração molecular, o que não é demorado o bastante para a difusão das outras moléculas. Mais importante ainda, a lisozima pertence à família de enzimas conhecidas como “glicosidases de retenção”. Além disso, todos os membros catalisam reações cujos produtos têm a mesma configuração anomérica dos substratos (a configuração anomérica dos carboidratos é examinada no Capítulo 7) e, sabe-se, têm intermediários covalentes reativos do tipo previsto na via alternativa (S_N2). Desse modo, o mecanismo de Phillips é antagônico aos achados experimentais de enzimas semelhantes.

Um experimento foi decisivo para pender a balança em favor do mecanismo via S_N2 , relatado por Stephen Withers e colaboradores em 2001. Usando uma enzima mutante (com o resíduo 35 alterado de Glu para Gln) e substratos artificiais, que, combinados, reduziram a velocidade das etapas-chave da reação, esses pesquisadores foram capazes de estabilizar o intermediário covalente fugaz. Isso permitiu que eles observassem o intermediário diretamente, usando espectrometria de massas e cristalografia de raios X (Figura 6-29b).

O mecanismo da lisozima estaria provado? Não. Uma característica-chave do método científico, como certa vez Albert Einstein resumiu, é que “mesmo uma infinidade de experimentos talvez não consiga provar que estou certo, mas um único experimento pode provar que estou errado”.

No caso do mecanismo da lisozima, pode-se argumentar (e muitos o fizeram) que os substratos artificiais com substituições por flúor em C-1 e C-2, usados para estabilizar os intermediários covalentes, podem alterar o curso da reação. O flúor altamente eletronegativo poderia desestabilizar um íon oxocarbênio elétron-deficiente já formado no cátion glicosila intermediário que ocorreria na via S_N1 . Mesmo assim, a via S_N2 é reconhecida hoje como o mecanismo mais compatível com os dados disponíveis.

O conhecimento de um mecanismo enzimático leva à produção de antibióticos úteis



A penicilina foi descoberta em 1928 por Alexander Fleming, mas foram necessários ainda 15 anos para que esse composto relativamente instável fosse conhecido o suficiente para poder ser utilizado como agente terapêutico no tratamento de infecções bacterianas. A penicilina interfere com a síntese do peptidoglicano, que é o principal componente da parede celular rígida que protege as bactérias contra a lise osmótica. O peptidoglicano é formado por polissacarídeos e peptídeos ligados por ligações cruzadas formadas em várias etapas, incluindo uma reação de transpeptidase (Figura 6-30). É essa a reação que é inibida pela penicilina e por compostos semelhantes (Figura 6-31a). Todos esses compostos são inibidores irreversíveis da transpeptidase e ligam-se ao sítio ativo por meio de um segmento que mimetiza a conformação do segmento D-Ala-D-Ala do precursor do peptidoglicano. A ligação peptídica do precursor é substituída pelo anel β -lactâmico altamente reativo da molécula do antibiótico. Quando a penicilina se liga à transpeptidase, a Ser do sítio ativo ataca a carbonila do anel β -lactâmico e gera um aduto covalente entre a penicilina e a enzima. Entretanto, o grupo de saída permanece ligado porque ele é ligado ao remanescente do anel β -lactâmico (Figura 6-31b). O complexo covalente inibe irreversivelmente a enzima. Isso, por sua vez, bloqueia a síntese da parede bacteriana e muitas bactérias morrem porque a membrana interna é frágil e se rompe devido à pressão osmótica.

O uso da penicilina e de seus derivados pelo homem levou ao surgimento de linhagens de bactérias patogênicas que expressam β -lactamases (Figura 6-32a), enzimas que clivam os antibióticos β -lactâmicos, inativando-os. Desse modo, a bactéria fica resistente a esses antibióticos. Os genes dessas enzimas se disseminaram rapidamente entre as populações de bactérias submetidas à pressão seletiva imposta pelo uso (muitas vezes, excessivo) dos antibióticos β -lactâmicos. A medicina respondeu com o desenvolvimento de compostos como o ácido clavulânico, um inativador suicida, que inativa irreversivelmente essas β -lactamases (Figura 6-32b). O ácido clavulânico mimetiza a estrutura dos antibióticos β -lactâmicos, formando um aduto covalente com a Ser do sítio ativo da β -lactamase. Isso leva a um rearranjo que cria um derivado muito mais reativo, que depois é atacado por outro nucleófilo no sítio ativo, de modo a acilar e inativar a enzima irreversivelmente. A amoxicilina e o ácido clavulânico são combinados na formulação farmacêutica amplamente usada e comercializada sob o nome de Calvulin. O ciclo da guerra química entre humanidade e bactérias continua sem tréguas. Foram descobertas al-

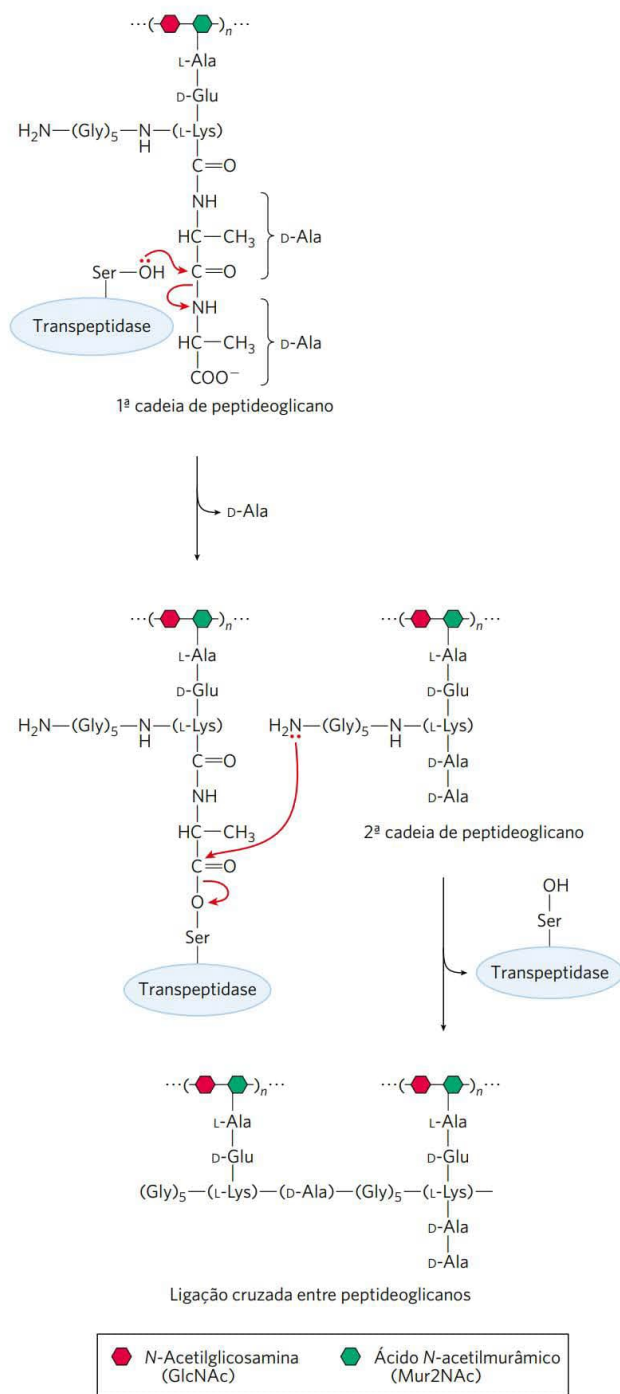


FIGURA 6-30 A reação da transpeptidase. Esta reação, que liga dois peptideoglicanos precursores em um polímero maior, é facilitada por uma Ser no sítio ativo por meio de um mecanismo catalítico covalente similar ao da quimotripsina. É importante ressaltar que esse peptideoglicano é um dos poucos casos na natureza em que aparecem D-aminoácidos. A Ser do sítio ativo ataca a carbonila da ligação peptídica entre dois resíduos de D-Ala, criando uma ligação éster (ligação covalente) entre o substrato e a enzima e liberando o resíduo terminal D-Ala. Um grupo amina do segundo precursor peptideoglicano, então, ataca a ligação éster, deslocando a enzima e ligando transversalmente os dois precursores entre si.

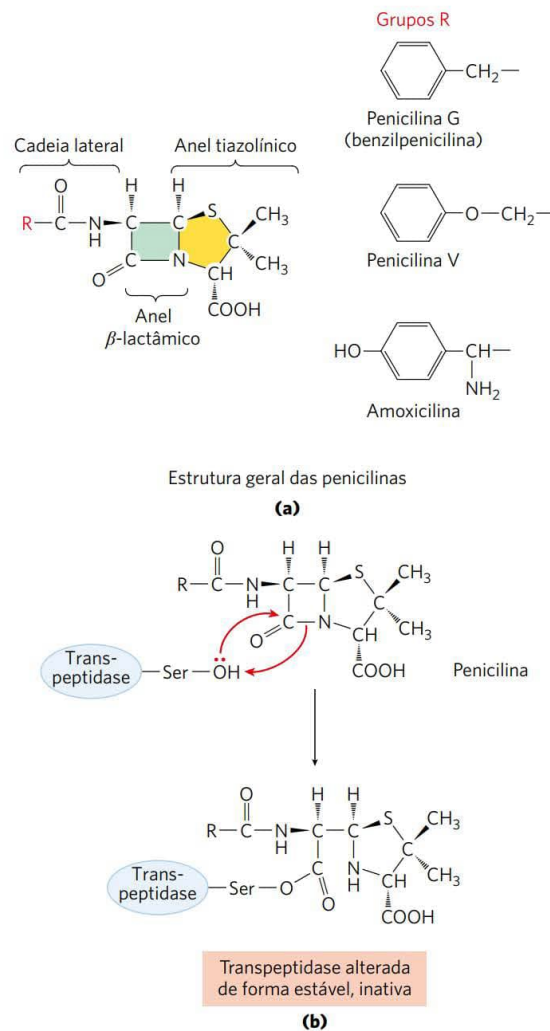


FIGURA 6-31 Inibição da transpeptidase por antibióticos β -lactâmicos. (a) Antibióticos β -lactâmicos têm um anel tiazolidina de cinco átomos fundido com um anel β -lactâmico. Este último anel é tensionado e inclui uma porção amida com papel crucial na inativação da síntese do peptideoglicano. O grupo R é diferente de um tipo de penicilina para outro. A penicilina G foi a primeira a ser isolada e permanece até hoje uma das mais eficazes. Devido à degradação no ambiente ácido do estômago, ela deve ser administrada por via injetável. Quase tão eficaz, a penicilina V é estável em meio ácido, por isso pode ser administrada por via oral. A amoxicilina tem ampla faixa de ação e apresenta rápida absorção quando administrada por via oral e por isso é o antibiótico β -lactâmico mais amplamente prescrito. (b) Ataque da porção amida do anel β -lactâmico pela Ser do sítio ativo da transpeptidase a um produto acil-enzima covalente que é hidrolisado tão lentamente que a formação do aduto é quase irreversível e, consequentemente, a transpeptidase é inativada.

gumas cepas de bactérias que causam doenças e são resistentes tanto à amoxicilina quanto ao ácido clavulânico. Algumas mutações na β -lactamase dessas cepas fazem elas não responderem ao ácido clavulânico. Prevê-se que o desenvolvimento de novos antibióticos venha a ser uma indústria que cresce no futuro próximo. ■

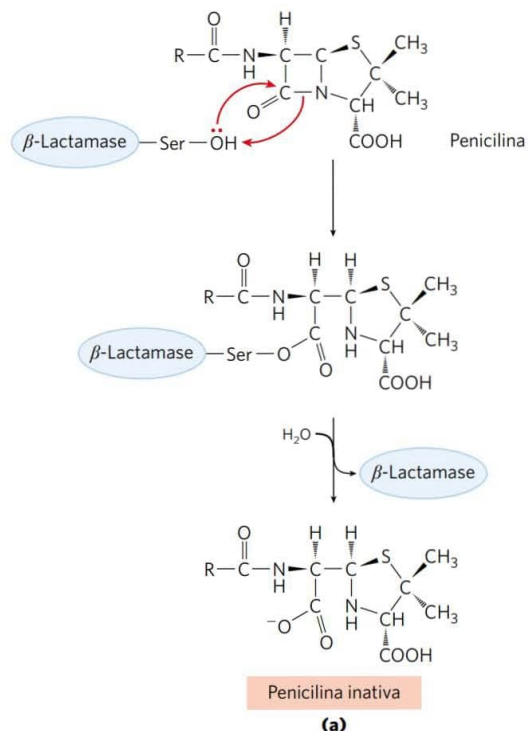
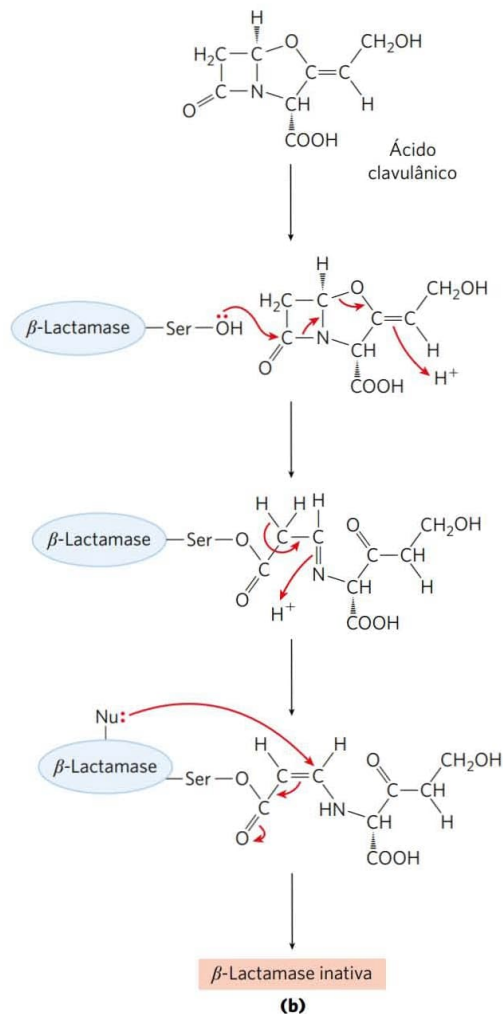


FIGURA 6-32 β -Lactamases e inibição de β -lactamases. (a) β -Lactamases atuam clivando o anel β -lactâmico dos antibióticos β -lactâmicos, inativando-os. (b) O ácido clavulânico é um inibidor suicida que usa o mecanismo químico normal das β -lactamases para formar uma espécie reativa no sítio ativo. Essa espécie reativa é atacada por um grupo nucleofílico (Nu:) no sítio ativo que acila irreversivelmente a enzima.



RESUMO 6.4 Exemplos de reações enzimáticas

- A quimotripsina é uma serino-protease com mecanismo bem conhecido, caracterizado por catálise geral ácido-básica, catálise covalente e estabilização do estado de transição.
- A hexocinase é um exemplo excelente de ajuste induzido como meio de usar a energia de ligação do substrato.
- A reação da enolase ocorre via catálise por íon metálico.
- A lisozima utiliza catálise covalente e catálise geral ácido-básica para promover duas reações sucessivas de deslocamento nucleofílico.
- O conhecimento do mecanismo de ação das enzimas permite desenvolver medicamentos que inibam a atividade de enzimas.

6.5 Enzimas regulatórias

No metabolismo celular, grupos de enzimas trabalham conjuntamente em vias sequenciais para realizar um determinado processo metabólico, como a degradação da glicose a lactato por uma série de reações ou as muitas reações da síntese de aminoácidos a partir de precursores simples. Nesses sistemas enzimáticos, o produto da reação de uma enzima é o substrato da enzima seguinte.

A maioria das enzimas das vias metabólicas segue os padrões cinéticos que foram descritos. Cada via, entretanto, inclui uma ou mais enzimas que exercem um grande efeito na velocidade de toda a sequência de reações. A atividade catalítica dessas **enzimas regulatórias** aumenta ou diminui em resposta a determinados sinais. Ajustes na velocidade das reações catalisadas por enzimas regulatórias e, portanto, ajustes na velocidade da sequência metabólica inteira permitem que as células atendam às necessidades de energia e das biomoléculas de que precisam para crescerem e se manterem.

As atividades das enzimas regulatórias são moduladas de várias maneiras. **Enzimas alostéricas** agem por meio de ligações reversíveis e não covalentes com compostos regulatórios, denominados **moduladores alostéricos** ou **efetores alostéricos**, que geralmente são metabólitos pequenos ou cofatores. Outras enzimas são reguladas por **modificações covalentes** reversíveis. Ambas as classes de enzimas regulatórias tendem a ser proteínas que possuem subunidades múltiplas e, em alguns casos, o(s) sítio(s) regulatório(s) e o sítio ativo se encontram

em subunidades separadas. Os sistemas metabólicos têm ao menos dois outros mecanismos de regulação enzimática. Algumas enzimas são estimuladas ou inibidas quando estão ligadas a **proteínas regulatórias** distintas. Outras são ativadas quando segmentos peptídicos são removidos por **proteólise**. Diferentemente da regulação mediada por efetores, a regulação por proteólise é irreversível. Exemplos importantes desses mecanismos são encontrados em processos fisiológicos como digestão, coagulação do sangue, ação hormonal e visão.

O crescimento e a sobrevivência das células dependem do uso eficiente dos recursos disponíveis, e essa eficiência é possibilitada pelas enzimas regulatórias. Não existe uma regra única que governe os vários tipos de regulação nos diferentes sistemas. Em certo grau, a regulação alostérica (não covalente) pode possibilitar os ajustes finos das vias metabólicas que constantemente são necessários e em níveis que variam em função das mudanças da atividade e das condições das células. A regulação por modificações covalentes pode ser do tipo “tudo ou nada”, normalmente no caso de proteólise, ou então possibilitar mudanças sutis na atividade. Vários tipos de regulação podem ocorrer em uma mesma enzima regulatória. O restante deste capítulo dedica-se à discussão desses métodos de regulação enzimática.

Enzimas alostéricas sofrem mudanças conformacionais em resposta à ligação de moduladores

Como foi visto no Capítulo 5, proteínas alostéricas são aquelas que possuem “outras formas” ou conformações induzidas pela ligação de moduladores. O mesmo conceito se aplica a certas enzimas regulatórias, pois mudanças conformacionais induzidas por um ou mais moduladores interconvertem formas mais ativas e formas menos ativas da enzima. Moduladores de enzimas alostéricas podem ser inibitórios ou estimulatórios. Muitas vezes, o modular é o próprio substrato. A regulação na qual o substrato e o modular são a mesma molécula é denominada homotrópica. O efeito é similar ao da ligação de O_2 à hemoglobina (Capítulo 5). No caso das enzimas, a ligação do ligante, ou do substrato, provoca mudanças na conformação que afetam a atividade subsequente de outros sítios da proteína. Em muitos casos, as mudanças conformacionais convertem uma conformação relativamente inativa (geralmente denominada estado T) em uma conformação mais ativa (estado R). Quando o modular é uma molécula diferente do substrato, diz-se que a enzima é heterotrópica. É importante ressaltar que os moduladores alostéricos não se confundem com os inibidores incompetitivos ou mistos. Embora os últimos se liguem a um segundo sítio da enzima, necessariamente não são mediadores de mudanças conformacionais entre formas ativas e inativas, de modo que os efeitos cinéticos são distintos.*

As propriedades das enzimas alostéricas são significativamente diferentes das propriedades das enzimas não regulatórias. Parte das diferenças é estrutural. Além do sítio ativo, as enzimas alostéricas geralmente têm um ou mais

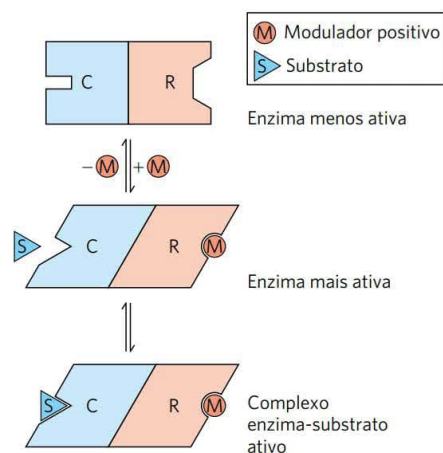
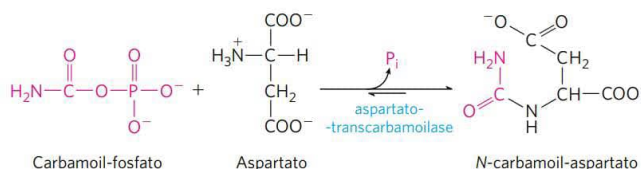


FIGURA 6-33 Interações entre as subunidades de enzimas alostéricas e interações com inibidores e ativadores. Em muitas enzimas alostéricas, o sítio de ligação ao substrato e o(s) sítio(s) de ligação(ões) com o modulador estão em subunidades diferentes, nas subunidades catalítica (C) e regulatória (R), respectivamente. A ligação de um modulador (M) positivo (estimulatório) ao sítio específico na subunidade regulatória é comunicada à subunidade catalítica por meio de uma mudança conformacional. Essa mudança afeta o sítio ativo, que, então, é capaz de ligar o substrato (S) com afinidade maior. Quando o modulador se dissocia da subunidade regulatória, a enzima volta a sua forma inativa ou menos ativa.

sítios regulatórios, ou alostéricos, para ligarem o modulador (**Figura 6-33**). Da mesma maneira que o sítio ativo das enzimas é específico para o seu substrato, cada sítio regulatório é específico para o seu modulador. Enzimas com vários moduladores em geral têm sítios de ligação específicos para cada um deles. Nas enzimas homotrópicas, o sítio ativo e o sítio regulatório são os mesmos.

As enzimas alostéricas geralmente são maiores que as enzimas não alostéricas, possuindo duas ou mais subunidades. Um exemplo clássico é a aspartato-transcarbamoilase (geralmente abreviada como ATCase), que catalisa uma reação inicial na biossíntese dos nucleotídeos de pirimidina, a reação entre carbamoil-fosfato e aspartato, formando carbamoil-aspartato.



A ATCase tem 12 cadeias polipeptídicas organizadas em 6 subunidades catalíticas (organizadas como 2 complexos triméricos) e 6 subunidades regulatórias (organizadas como 3 complexos diméricos). A **Figura 6-34** mostra a estrutura quaternária dessa enzima, deduzida da análise por raios X. A enzima exibe um comportamento alostérico, detalhado a seguir, à medida que as subunidades catalíticas funcionam cooperativamente. As subunidades regulatórias têm sítios de ligação para ATP e CTP, que funcionam como reguladores positivo e negativo, respectivamente. CTP é um dos produtos finais da via, e a regula-

*N. de R.T. outra distinção é que esses inibidores são exógenos, ao passo que os moduladores alostéricos são produzidos pela própria célula.

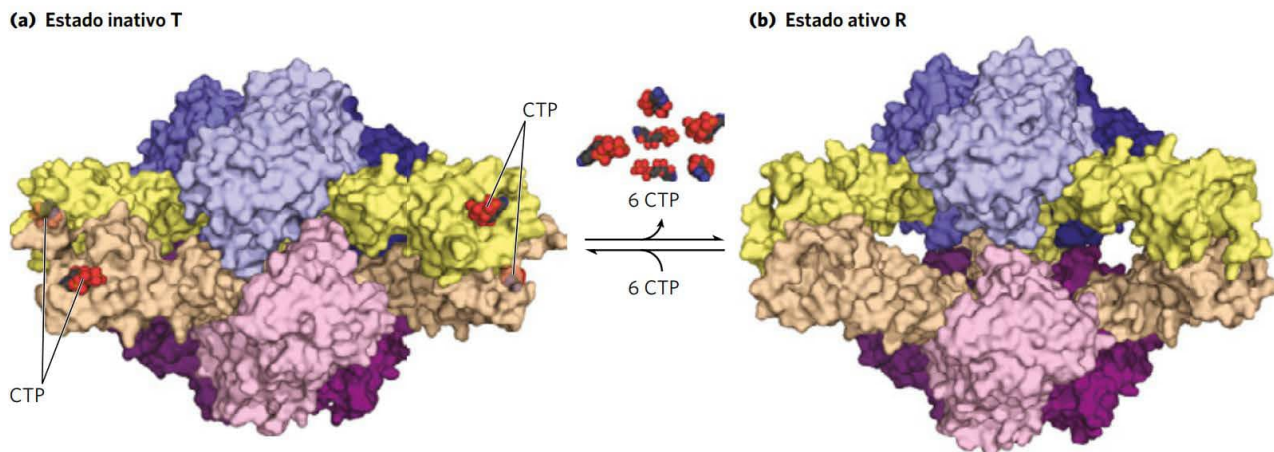


FIGURA 6-34 A enzima regulatória aspartato-transcarbamoilase. (a) Estado T inativo e (b) estado R ativo. Esta enzima de regulação alostérica tem dois agrupamentos catalíticos volumosos, cada um com três cadeias polipeptídicas (sombreadas em azul e roxo) e três agrupamentos regulatórios, cada um com duas cadeias regulatórias (em bege e amarelo). Os agrupamentos regulatórios formam os pontos de um triângulo (não evidente nesta imagem) rodeado pelas subunidades catalíticas. Os sítios de ligação para os moduladores alostéricos (incluindo CTP) estão nas subunidades regulatórias. A ligação com o modulador provoca grandes mudanças na conformação e na atividade da enzima. O papel desta enzima na síntese de nucleotídeos e detalhes da sua regulação são discutidos no Capítulo 22. [Fontes: (a) PDB ID 1RAB, R. P. Kosman et al., *Proteins* 15:147, 1993. (b) PDB ID 1F1B, L. Jin et al., *Biochemistry* 39:8058, 2000.]

ção negativa por CTP serve para limitar a ação da ATCase em condições nas quais CTP é abundante. Por outro lado, altas concentrações de ATP indicam que o metabolismo celular está robusto, a célula está crescendo e uma quantidade adicional de nucleotídeos de pirimidina é necessária para dar suporte para a transcrição do RNA e para a replicação do DNA.

As propriedades cinéticas das enzimas alostéricas não seguem o comportamento de Michaelis-Menten

As enzimas alostéricas apresentam relações entre V_0 e $[S]$ diferentes daquelas da cinética de Michaelis-Menten. Elas apresentam saturação pelo substrato quando $[S]$ é suficientemente alta, mas algumas das enzimas alostéricas apresentam um gráfico de V_0 versus $[S]$ (Figura 6-35) que produz uma curva de saturação sigmoide, em vez da curva de saturação hiperbólica típica das enzimas não regulatórias. Na curva de saturação sigmoide verifica-se um valor de $[S]$ no qual V_0 é metade da V_{\max} , mas que não é considerado como K_m , pois a enzima não segue uma relação de Michaelis-Menten hiperbólica. Os símbolos $[S]_{0,5}$ e $K_{0,5}$ geralmente são usados para representar a concentração de substrato que dá uma velocidade que é metade da máxima das enzimas alostéricas (Figura 6-35).

O comportamento da cinética sigmoide em geral reflete interações cooperativas entre as subunidades proteicas. Em outras palavras, mudanças na estrutura de uma subunidade são convertidas em mudanças estruturais nas subunidades adjacentes, efeito mediado por interações não covalentes na interface das subunidades. Esses princípios são ilustrados muito bem pelos processos não enzimáticos nos quais o O_2 se liga à hemoglobina. O comportamento de cinética sigmoide é explicado por modelos de interações sequenciais concatenadas entre as subunidades (ver Figura 5-15).

A ATCase ilustra perfeitamente bem tanto o comportamento da cinética homotrópica quanto da cinética heterotrópica. A ligação dos substratos, aspartato e carbamoil-fosfato, à enzima leva gradualmente à transição do estado T relativamente inativo ao estado mais ativo R. Isso é responsável pela mudança sigmoide e não hiperbólica na V_0 devido ao aumento de $[S]$. Uma característica da cinética sigmoide é a de que pequenas mudanças na concentração do modulador podem levar a grandes mudanças na atividade da enzima. A Figura 6-35a mostra como um aumento relativamente pequeno em $[S]$ na fase de ascendente da curva provoca um aumento comparativamente grande em V_0 .

A regulação heterotrópica da ATCase é devida à interação com ATP e CTP. No caso de enzimas alostéricas heterotrópicas, um ativador pode fazer a curva se tornar mais próxima de uma hipérbole, com diminuição no $K_{0,5}$, mas sem mudança na V_{\max} , resultando em aumento na velocidade de reação em uma concentração de substrato fixa. No caso da ATCase, a interação com ATP provoca isso, e a enzima mostra uma curva V_0 versus $[S]$ característica do estado ativo R em concentrações suficientemente altas de ATP (V_0 é maior para qualquer valor de $[S]$; Figura 6-35b). Um modulador negativo (inibidor) produz uma curva de saturação pelo substrato muito mais sigmoide, com um aumento de $K_{0,5}$, como é ilustrado pelos efeitos do CTP sobre a cinética da ATCase (ver curvas do modulador negativo na Figura 6-35b). Outras enzimas alostéricas heterotrópicas respondem a um ativador aumentando a V_{\max} com pequena mudança em $K_{0,5}$ (Figura 6-35c). Portanto, enzimas alostéricas heterotrópicas mostram diferentes tipos de respostas nas curvas atividade-substrato, pois algumas têm moduladores inibidores, enquanto outras têm moduladores ativadores, e ainda outras (como a ATCase) têm os dois tipos de moduladores.

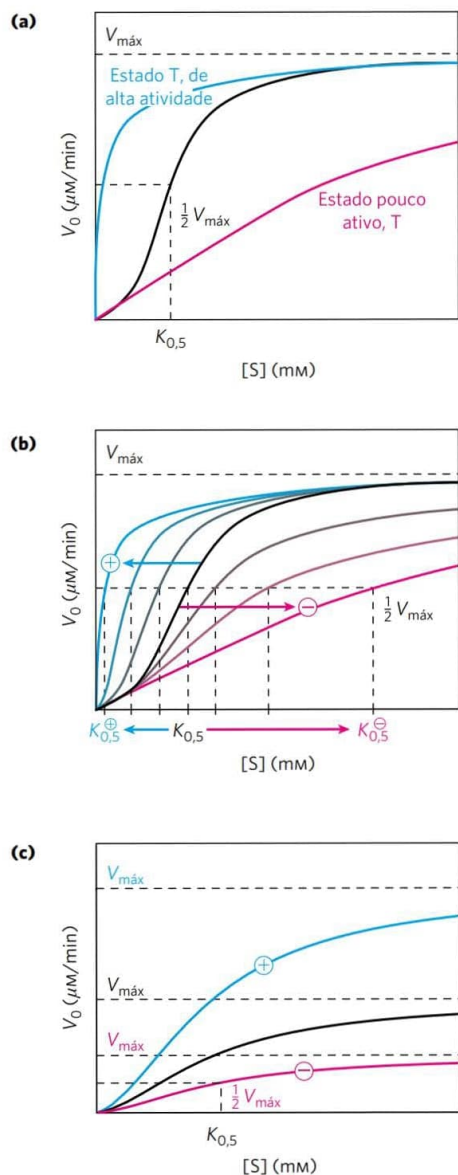


FIGURA 6-35 Curvas de substrato-atividade de enzimas alostéricas representativas. Três exemplos das respostas complexas das enzimas alostéricas aos seus moduladores. **(a)** Curva sigmoide de uma enzima homotrópica, na qual o substrato também atua como modulador positivo (estimulador). Observe a semelhança com a curva de saturação com oxigênio da hemoglobina (ver Figura 5-12). A curva sigmoide é uma curva híbrida na qual a enzima está presente primordialmente no estado relativamente inativo T em baixa concentração de substrato e principalmente no estado mais ativo R em alta concentração de substrato. As curvas dos estados puros T e R estão colocadas separadamente e coloridas. A ATCase apresenta um padrão cinético similar a esse. **(b)** Efeitos de várias concentrações diferentes de um modulador positivo (+) ou modulador negativo (–) sobre uma enzima alostérica na qual há alteração em $K_{0,5}$ sem haver alteração em $V_{\text{máx}}$. A curva central mostra a relação substrato-atividade na ausência de modulador. No caso da ATCase, CTP é um modulador negativo, e ATP, modulador positivo. **(c)** Um tipo de modulação menos comum na qual a $V_{\text{máx}}$ é alterada e $K_{0,5}$ permanece praticamente constante.

Algumas enzimas são reguladas por modificações covalentes reversíveis

Em outra classe de enzimas regulatórias, a atividade é modulada por modificações covalentes em um ou mais dos resíduos de aminoácidos da molécula da enzima. Mais de 500 tipos diferentes de modificações covalentes foram encontrados nas proteínas. Em geral, os grupos modificadores incluem fosforila, acetila, adenilila, uridilila, metila, amida, carboxila, miristoíla, palmitoíla, prenila, hidroxila, sulfato e ribosiladenosina-difosfato (**Figura 6-36**). Existem até proteínas inteiras que são usadas como grupo modificador especial, incluindo a ubiquitina e a SUMO. Geralmente, todos esses grupos são ligados e removidos da enzima que é regulada por outras enzimas. A modificação de um resíduo de aminoácido de uma enzima faz, efetivamente, um novo resíduo de aminoácido com propriedades diferentes ser introduzido na enzima. A introdução de uma carga pode alterar as propriedades locais da enzima e introduzir uma mudança na conformação. A introdução de um grupo hidrofóbico pode desencadear uma associação com uma membrana. Normalmente, essas mudanças são substanciais e podem ser fundamentais para a função da enzima assim alterada.

A variedade de modificações nas enzimas é grande demais para ser vista em detalhes, porém alguns exemplos são instrutivos. A proteína de quimiotaxia que aceita metilação, presente em bactérias, é uma das enzimas que são reguladas por metilação. Essa proteína é parte de um sistema que permite às bactérias nadarem na direção de um atrator (como um açúcar) ou se afastarem de um repelente químico. O agente metilante é a *S*-adenosilmetionina (adoMet) (ver Figura 18-18). A acetilação é uma modificação comum em aproximadamente 80% das enzimas solúveis dos procariontes, incluindo acetilação no aminoterminal. A ubiquitina é adicionada a proteínas como uma etiqueta que as marca como destinadas para serem degradadas por proteólise (ver Figura 27-49). A ubiquitinação também pode ter função regulatória. A SUMO é encontrada ligada a muitas proteínas nucleares de eucariotes e atua na regulação da transcrição, na estrutura da cromatina e no reparo de DNA.

A ADP-ribosilação é uma reação muito interessante que ocorre em certas proteínas. A ADP-ribose é derivada da nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NAD) (ver Figura 8-41). Esse tipo de modificação ocorre na enzima bacteriana dinitrogenase-redutase e regula a fixação biológica de nitrogênio, um processo muito importante. A toxina diftérica e a toxina do cólera são enzimas que catalisam a ADP-ribosilação (e a inativação) de enzimas ou proteínas celulares importantes.

A fosforilação é o tipo mais comum de modificação regulatória. Estima-se que um terço de todas as proteínas de uma célula eucariótica seja fosforilado de modo que um ou, mais frequentemente, vários eventos de fosforilação são parte de quase todos os processos regulatórios. Algumas proteínas têm apenas um resíduo fosforilado, outras têm vários e poucas têm dezenas de sítios de fosforilação. Esse tipo de modificação covalente é central para um grande número de vias regulatórias. Isso será discutido com alguns detalhes a seguir e novamente no Capítulo 12.

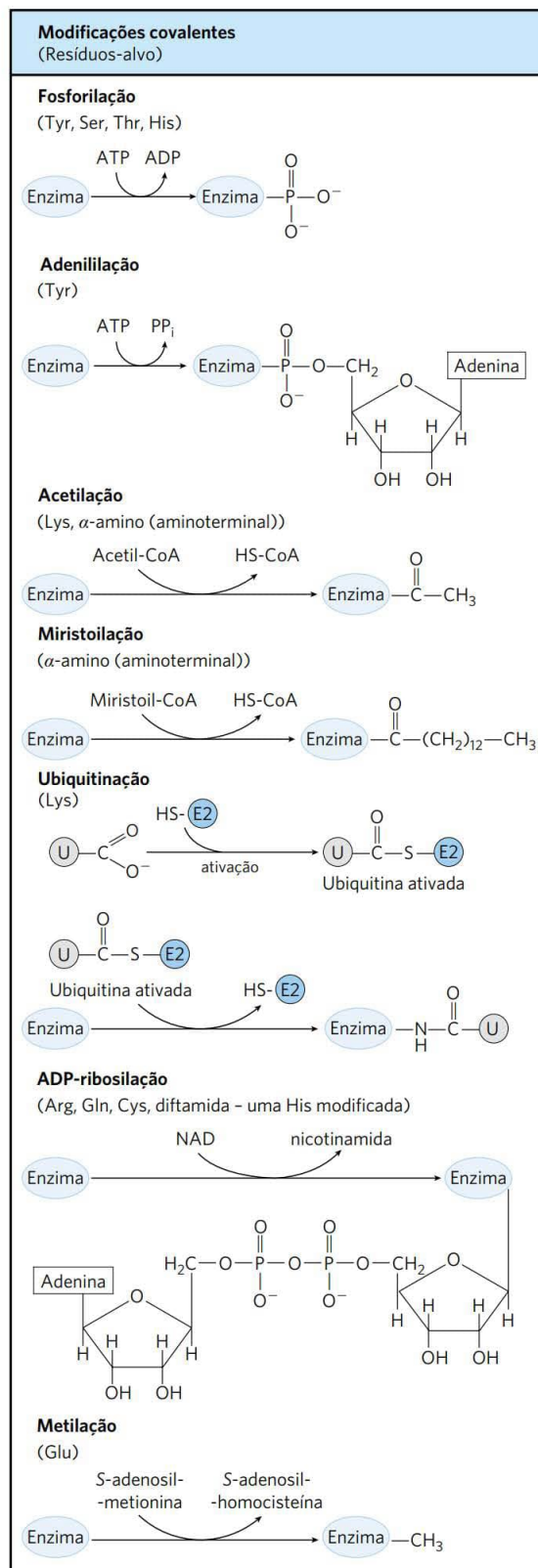


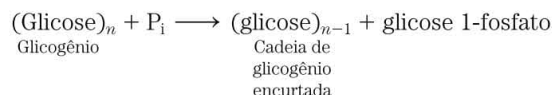
FIGURA 6-36 Algumas reações de modificações em enzimas.

Todos esses tipos de modificações serão encontrados novamente em capítulos posteriores.

Os grupos fosforila afetam a estrutura e a atividade catalítica das enzimas

A ligação de grupos fosforila a resíduos de aminoácidos específicos de proteínas é catalisada por **proteínas-cinase**. No genoma humano, são encontrados mais de 500 genes que codificam essas enzimas de importância fundamental. Nas reações que eles catalisam, o grupo γ -fosforila derivado de um nucleosídeo trifosfato (geralmente ATP) é transferido para um determinado resíduo de Ser, Thr ou Tyr (às vezes His) da proteína-alvo. Isso introduz um grupo carregado volumoso em uma região da proteína que é apenas moderadamente polar. Os átomos de oxigênio do grupo fosforila podem formar ligações de hidrogênio com um ou mais grupos da proteína, normalmente grupos amida do esqueleto peptídico no começo de α -hélices ou com o grupo guanidino carregado dos resíduos de Arg. As duas cargas negativas de uma cadeia lateral fosforilada também podem repelir resíduos carregados negativamente (Asp ou Glu) presentes nas redondezas. Quando a modificação da cadeia lateral se localiza em uma região da enzima que seja crucial para a estrutura tridimensional da enzima, a fosforilação pode ter efeitos drásticos sobre a conformação e, portanto, sobre a ligação com o substrato e a catálise. A remoção de grupos fosforila das proteínas-alvo é catalisada por **fosfoproteínas-fosfatases**, também chamadas mais simplesmente de **proteína-fosfatase**.

Um exemplo importante de enzima regulada por fosforilação é o caso da glicogênio-fosforilase (M_r 94.500) muscular e hepática (Capítulo 15), que catalisa a reação



A glicose-1-fosfato assim formada pode ser usada para a síntese de ATP no músculo ou ser convertida em glicose livre no fígado. Observe que a glicogênio-fosforilase, embora adicione um fosfato a um substrato, não é, ela própria uma cinase porque não utiliza ATP ou qualquer outro nucleotídeo trifosfato como doador de fosfato na reação que catalisa. Entretanto, ela é o substrato de uma proteína-cinase que a fosforila. Os grupos fosforila, foco da discussão a seguir, são aqueles envolvidos na regulação da enzima e não na função catalítica.

A glicogênio-fosforilase ocorre em duas formas: a fosforilase *a* (mais ativa) e a fosforilase *b* (menos ativa) (**Figura 6-37**). A fosforilase *a* tem duas subunidades, cada uma com um resíduo específico de Ser que é fosforilado no grupo hidroxila. Esses resíduos de serina-fosfato são necessários para a atividade máxima da enzima. Os grupos fosforila podem ser removidos hidroliticamente por uma outra enzima, chamada de fosfoproteína-fosfatase 1 (PP1):

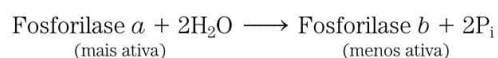


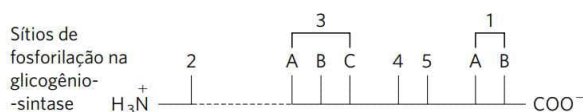
TABELA 6-10 Sequências-consenso das proteínas-quinase

Proteína-quinase	Sequência-consenso e resíduos fosforilados
Proteína-quinase A	-x-R-[RK]-x-[ST]-B-
Proteína-quinase G	-x-R-[RK]-x-[ST]-X-
Proteína-quinase C	-[RK](2)-x-[ST]-B-[RK](2)-
Proteína-quinase B	-x-R-x-[ST]-x-K-
Ca ²⁺ /calmodulina-quinase I	-B-x-R-x(2)-[ST]-x(3)-B-
Ca ²⁺ /calmodulina-quinase II	-B-x-[RK]-x(2)-[ST]-x(2)-
Cinase da cadeia leve da miosina (músculo liso)	-K(2)-R-x(2)-S-x-B(2)-
Fosforilase-b-quinase	-K-R-K-Q-I-S-V-R-
Cinase extracelular regulada por sinal (ERK)	-P-x-[ST]-P(2)-
Proteína-quinase dependente de ciclina (cdc2)	-x-[ST]-P-x-[KR]-
Caseína-quinase I	-[SpTp]-x(2)-[ST]-B ^a
Caseína-quinase II	-x-[ST]-x(2)-[ED]-x-
Cinase do receptor β -adrenérgico	-[DE](n)-[ST]-x(3)
Rodopsina-quinase	-x(2)-[ST]-E(n)-
Cinase do receptor de insulina	-x-E(3)-Y-M(4)-K(2)-S-R-G-D-Y-M-T-M-Q-I-G-K(3)-L-P-A-T-G-D-Y-M-N-M-S-P-V-G-D-
Cinase do receptor do fator de crescimento do epitélio (EGF)	-E(4)-Y-F-E-L-V-

Fontes: L. A. Pinna e M. H. Ruzzene, *Biochim. Biophys. Acta* 1314:191, 1996; B. E. Kemp e R. B. Pearson, *Trends Biochem. Sci.* 15:342, 1990; P. J. Kennelly e E. G. Krebs, *J. Biol. Chem.* 266:15,555, 1991.

Nota: estão mostradas as sequências-consenso deduzidas (em caracteres normais) e as sequências verdadeiras obtidas de substratos já conhecidos (em itálico). Os resíduos de Ser (S), Thr (T) e Tyr (Y) que sofrem fosforilação estão em vermelho. Todos os resíduos de aminoácidos estão representados com a abreviação de uma letra (ver Tabela 3-1). X representa qualquer aminoácido; B representa qualquer aminoácido hidrofóbico; Sp e Tp representam resíduos de Ser e Thr que devem estar previamente fosforilados para que a cinase reconheça o sítio.

^aO melhor sítio-alvo tem dois resíduos de aminoácidos separando os resíduos-alvo fosforilados de Ser/Thr; sítios-alvo separados por um ou três resíduos funcionam em nível reduzido.



Cinase	Sítios de fosforilação	Grau de inativação da síntese
Proteína-quinase A	1A, 1B, 2, 4	+
Proteína-quinase G	1A, 1B, 2	+
Proteína-quinase C	1A	+
Ca ²⁺ /calmodulina-quinase	1B, 2	+
Fosforilase b cinase	2	+
Caseína-quinase I	Pelo menos nove	+++
Caseína-quinase II	5	0
Glicogênio-sintase-quinase 3	3A, 3B, 3C	+++
Glicogênio-sintase-quinase 4	2	+

põem o sítio ativo da enzima. Como esse tipo de ativação é irreversível, são necessários outros mecanismos para inativar essas enzimas. As proteases são inibidas por proteínas inibidoras que se ligam firmemente aos seus sítios ativos. Por exemplo, o inibidor da tripsina pancreática (M_r 6.000) liga-se à tripsina e a inibe. A α 1-antiproteínase (M_r 53.000) inibe principalmente a elastase de neutrófilos (neutrófilos são um tipo de leucócitos, ou glóbulos brancos do sangue. A elastase é uma protease que age sobre a elastina, um componente de alguns tecidos conectivos). A insuficiência de α 1-antiproteínase, que pode ser uma das consequências do hábito de fumar, tem sido associada com dano pulmonar, incluindo o enfisema.

Apenas proteases são ativadas por proteólise. Em outros casos, entretanto, os precursores não são chamados de zimogênios, mas, de maneira mais geral, são denominados **pró-proteínas** ou **pró-enzimas**, conforme o caso.

FIGURA 6-38 Múltiplas fosforilações regulatórias. A enzima glicogênio-sintase tem pelo menos nove sítios separados, localizados em cinco regiões, suscetíveis à fosforilação por uma das proteínas-quinases celulares. Portanto, a regulação dessa enzima não é binária (liga/desliga), mas é modulada finamente com uma grande amplitude em resposta a uma gama de sinais.

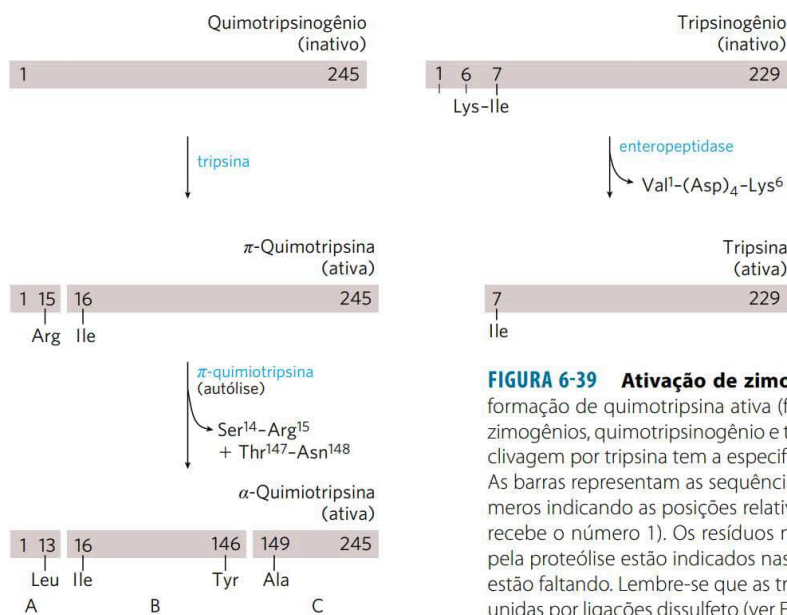


FIGURA 6-39 Ativação de zimogênios por clivagem proteolítica. A figura mostra a formação de quimotripsina ativa (formalmente, α -quimotripsina) e tripsina a partir dos seus zimogênios, quimotripsinogênio e tripsinogênio. O intermediário π -quimotripsina gerado pela clivagem por tripsina tem a especificidade um pouco diferente em relação à α -quimotripsina. As barras representam as sequências de aminoácidos das cadeias polipeptídicas, com os números indicando as posições relativas dos resíduos (o resíduo de aminoácido aminoterminal recebe o número 1). Os resíduos nas extremidades dos fragmentos polipeptídicos gerados pela proteólise estão indicados nas barras. Observe que, na forma ativa final, alguns resíduos estão faltando. Lembre-se que as três cadeias polipeptídicas (A, B e C) da quimotripsina estão unidas por ligações dissulfeto (ver Figura 6-20).

Por exemplo, o colágeno (proteína do tecido conectivo) é inicialmente sintetizado como precursor solúvel, o pró-colágeno.

A coagulação do sangue é mediada por uma cascata complicada de ativações proteolíticas

O coágulo sanguíneo é um agregado de fragmentos celulares, denominados plaquetas, em ligações cruzadas e estabilizado por fibras proteináceas, formadas principalmente por fibrina (**Figura 6-40a**). A fibrina é derivada de um zimogênio denominado fibrinogênio. Depois das albuminas e das globulinas, o fibrinogênio geralmente é o terceiro tipo de proteína mais abundante no plasma sanguíneo. A formação do coágulo sanguíneo é um exemplo bem-estudado de **cascata regulatória**, mecanismo que proporciona respostas muito sensíveis a um sinal molecular e de amplificação do sinal. Essas vias também têm vários outros tipos de regulação.

Nas cascatas regulatórias, um sinal leva à ativação de uma proteína X. A proteína X catalisa a ativação da proteína Y, a proteína Y catalisa a ativação da proteína Z, e assim por diante. Uma vez que as proteínas X, Y e Z são catalisadores e ativam muitas cópias da proteína seguinte na cascata, o sinal é amplificado em cada etapa. Em alguns casos, a etapa de ativação envolve a clivagem proteolítica e, portanto, a etapa é efetivamente irreversível. Em outros casos, a ativação envolve modificações facilmente reversíveis de proteínas, como a fosforilação. Cascatas regulatórias governam uma grande variedade de processos biológicos, incluindo, além da coagulação do sangue, alguns aspectos do destino das células durante o desenvolvimento, a detecção de luz pelos bastonetes da retina e a morte celular programada (apoptose).

O **fibrinogênio** é um dímero de heterotrímeros ($A\alpha_2B\beta_2\gamma_2$), com três tipos de subunidades diferentes,

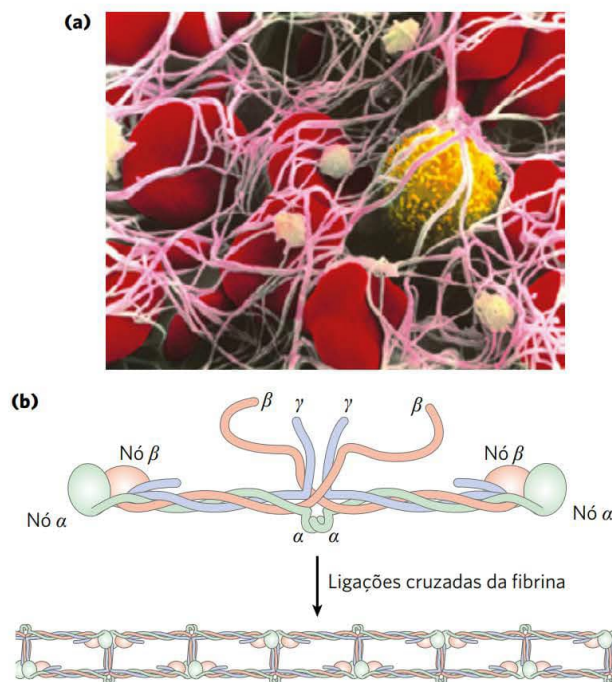


FIGURA 6-40 O papel da fibrina na coagulação sanguínea. (a) O coágulo de sangue consiste em um agregado de plaquetas (células pequenas e de coloração leve) mantidas coesas por moléculas de fibrina ligadas entre si por ligações cruzadas. Eritrócitos (em vermelho nesta micrografia eletrônica de varredura colorizada) também ficam presos no emaranhado da matriz. (b) O fibrinogênio, uma proteína solúvel do plasma, é formado por dois complexos de subunidades α , β e γ ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$). A remoção do peptídeo aminoterminal das subunidades α e β (não mostrado) leva à formação de um complexo altamente organizado e com ligações cruzadas covalentes, o que resulta na formação de fibras de fibrina. Os "nós" são domínios globulares nas extremidades resultantes da proteólise das subunidades. [Fonte: (a) CNRI/Science Source.]

mas relacionadas evolutivamente (Figura 6-40b). O fibrinogênio é convertido em **fibrina** ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$), e, assim, ele é ativado para coagular o sangue. Isso se dá pela remoção proteolítica de 16 resíduos de aminoácidos da extremidade aminoterminal (o peptídeo A) de cada subunidade α e 14 resíduos de aminoácidos da extremidade aminoterminal (o peptídeo B) de cada subunidade β . A remoção do peptídeo é catalisada pela **trombina**. A nova extremidade aminoterminal das subunidades α e β se encaixa perfeitamente em sítios de ligação da porção carboxiterminal das subunidades γ e β , respectivamente, de uma outra molécula de fibrina. Assim, a fibrina polimeriza e forma uma matriz gelatinosa, gerando o coágulo mole. Ligações covalentes cruzadas entre moléculas de fibrina associadas são formadas pela condensação de determinados resíduos de Lys de um heterotrímero de fibrina com resíduos de Gln de outro, catalisada por uma transglutaminase, chamada de **fator XIIIa**. A formação de ligações cruzadas converte o coágulo mole em coágulo duro.

A ativação do fibrinogênio, produzindo fibrina, é o ponto final de não apenas uma, mas de duas cascatas regulatórias interligadas (**Figura 6-41**). Uma delas é chamada de via de ativação por contato (“contato” refere-se à interação de componentes-chave desse sistema com fosfolípidos aniônicos presentes na superfície de plaquetas no local da ferida). Uma vez que todos os componentes dessa via estão presentes no plasma sanguíneo, ela é também chamada de **via intrínseca**. A segunda via é a via tecidual ou **via extrínseca**. Um dos componentes principais dessa via, a proteína **fator tissular (TF)**, não está presente na corrente sanguínea. A maioria dos fatores proteicos de ambas as vias são designados por números romanos. Muitos desses fatores são serina-proteases semelhantes à quimotripsina, com os zimogênios precursores sintetizados no fígado e exportados para o sangue. Outros fatores são proteínas regulatórias que se ligam às serina-proteases e ajudam a ativá-las.

A coagulação do sangue inicia com a ativação de **plaquetas** – fragmentos celulares especializados sem núcleo – circulantes no local da lesão. Devido ao dano tecidual, as moléculas de colágeno presentes abaixo da camada de células epiteliais que reveste cada vaso sanguíneo tornam-se expostas ao sangue. A ativação das plaquetas é principalmente desencadeada por interação com esse colágeno. A ativação leva à apresentação de fosfolípidos aniônicos na superfície das plaquetas e à liberação de moléculas sinalizadoras, como as **tromboxanas** (p. 375), que ajudam a estimular a ativação de mais plaquetas. As plaquetas ativadas agregam-se no local da lesão, formando um coágulo frouxo. A estabilização do coágulo agora necessita da fibrina gerada pela cascata da coagulação.

A via extrínseca atua primeiro. A lesão do tecido expõe o plasma sanguíneo ao TF embebido em grande quantidade nas membranas de fibroblastos e células do músculo liso que estão logo abaixo da camada endotelial. Há a formação de um complexo inicial entre TF e fator VII, presente no plasma sanguíneo. O **fator VII** é um zimogênio de serina-protease, e o TF é uma proteína regulatória que é necessária para a função do fator VII. O fator VII é convertido na sua forma ativa, **fator VIIa**, por clivagem proteolítica catalisada pelo **fator Xa** (outra serina-protease). Então, o

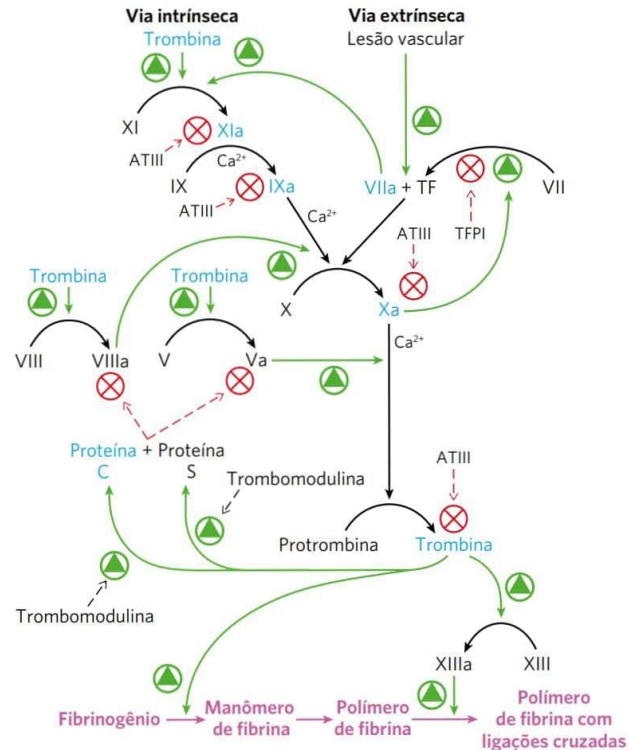


FIGURA 6-41 A cascata da coagulação. As interações cruzadas entre as vias intrínseca e extrínseca levam à clivagem do fibrinogênio, o que leva à formação de trombina ativa, como mostrado. As serina-proteases ativas estão mostradas em azul. As setas verdes indicam etapas de ativação, e as setas vermelhas, processos inibitórios.

complexo TF-VIIa cliva o **fator X**, criando a sua respectiva forma ativa, fator Xa.

Se TF-VIIa é necessário para clivar X e Xa é necessário para clivar TF-VII, como o processo se inicia? Uma pequena quantidade de fator VIIa está presente no sangue o tempo todo, quantidade suficiente para formar pequenas quantidades do complexo ativo TF-VIIa imediatamente quando da lesão ao tecido. Isso possibilita a formação de fator Xa e estabelece a alça de retroalimentação inicial. Uma vez que os níveis de fator Xa começam a se elevar, o fator Xa (na forma de complexo com a proteína regulatória fator Va) cliva a protrombina, produzindo a forma ativa trombina, e a trombina cliva o fibrinogênio.

A via extrínseca proporciona, assim, uma grande produção de trombina. Entretanto, o complexo TF-VIIa é rapidamente inativado pela **proteína inibidora de fator tecidual (TFPI)**. A formação do coágulo é sustentada pela ativação de componentes da via intrínseca. O **fator IX** é convertido na serina-protease ativa **fator IXa** pela protease TF-VIIa durante o início da sequência da coagulação. O fator IXa, complexado com a proteína regulatória **VIIIa**, é relativamente estável e proporciona uma enzima alternativa para a conversão proteolítica do fator X a fator Xa. O fator IXa ativado pode também ser produzido pela serina-protease fator XIa. A maior parte de XIa é gerada pela clivagem do zimogênio **fator XI** pela trombina em uma alça de retroalimentação.

Deixada sem controle, a coagulação sanguínea pode acabar bloqueando os vasos sanguíneos e levar a um infarto do miocárdio. É necessário que haja uma regulação maior ainda. À medida que o coágulo firme (ou coágulo duro) se forma, vias regulatórias agem para limitar o tempo durante o qual a cascata da coagulação está ativa. Além de clivar o fibrinogênio, a trombina também forma um complexo com uma proteína embebida na superfície do lado vascular das células endoteliais, a **trombomodulina**. O complexo trombina-trombomodulina cliva o zimogênio da protease **proteína C**. A proteína C ativada, na forma de complexo com uma proteína regulatória (**proteína S**), cliva e inativa os fatores Va e VIIIa, levando à supressão da cascata toda. Outra proteína, **antitrombina III (ATIII)**, é um inibidor de serina-protease. ATIII forma um complexo covalente 1:1 entre um resíduo de Arg da ATII e o resíduo de Ser do sítio ativo de serina-proteases, sobretudo trombina e fator Xa. Esses dois sistemas regulatórios, de forma concatenada com TFPI, ajudam a estabelecer um limiar ou nível de exposição ao TF necessário para ativar a cascata da coagulação. Indivíduos com defeitos genéticos que eliminam ou diminuem os níveis sanguíneos de proteína C ou de ATIII apresentam alto risco de trombose (formação inapropriada de coágulos sanguíneos).

O controle da coagulação sanguínea tem um papel importante na prática médica, principalmente para evitar que o sangue coagule durante cirurgias e em pacientes com risco de infarto do miocárdio ou trombose. Do ponto de vista clínico, várias abordagens estão disponíveis. A primeira aproveita outra característica de várias das proteínas da cascata da coagulação e que não foram ainda consideradas. Os fatores VII, IX, X e a protrombina, juntamente com as proteínas C e S, têm sítios de ligação ao cálcio cruciais para as respectivas funções. Nesse caso, os sítios de ligação ao cálcio são formados por modificações de vários resíduos de Glu próximos à extremidade N-terminal dessas proteínas, transformando-os em resíduos de **γ -carboxiglutamato**

(abreviatura **Gla**; p. 81). A modificação de Glu para Gla é catalisada por enzimas que dependem da atividade da vitamina K, uma vitamina lipossolúvel (p. 380). O cálcio ligado a essas proteínas promove a aderência destas a fosfolípidos aniônicos que aparecem na superfície de plaquetas ativadas, fazendo os fatores da coagulação se localizarem na área onde o coágulo deve se formar. Antagonistas da vitamina K, como a **varfarina** (Cumadina), são, comprovadamente, altamente eficientes como anticoagulantes. Uma segunda abordagem para inibir a coagulação é a administração de heparina. **Heparinas** são polissacarídeos altamente sulfatados (ver Figura 7-22). Elas agem como anticoagulantes por aumentarem a afinidade da ATIII pelo fator Xa e pela trombina, facilitando, assim, a inativação de elementos-chave da cascata (ver Figura 7-26). Finalmente, o **ácido acetilsalicílico** (acetilsalicilato; Figura 21-15b) é um anticoagulante efetivo. O ácido acetilsalicílico inibe a enzima cicloxigenase, necessária para a produção de tromboxanas. À medida que ele reduz a liberação de tromboxanas pelas plaquetas, a capacidade de agregação das plaquetas diminui.

Recém-nascidos com uma deficiência em algum dos vários componentes da cascata da coagulação têm grande tendência ao sangramento, desde leve até praticamente incontável, uma condição mortal. Defeitos genéticos nos genes que codificam as proteínas necessárias para a coagulação sanguínea são a causa de doenças conhecidas como hemofilias. A hemofilia A é uma doença ligada ao sexo que resulta da deficiência de fator VIII. Ela é a hemofilia humana mais comum, afetando um em cada 5 mil homens no mundo todo. O exemplo mais famoso de herança da hemofilia A ocorre entre a nobreza europeia. A rainha Vitória (1819-1901), sem dúvida, foi uma portadora. O príncipe Leopoldo, seu oitavo filho, sofria de hemofilia A e morreu aos 31 anos após sofrer uma pequena queda. Ao menos duas de suas filhas eram portadoras e passaram o gene defeituoso para outras famílias reais europeias (**Figura 6-42**). ■

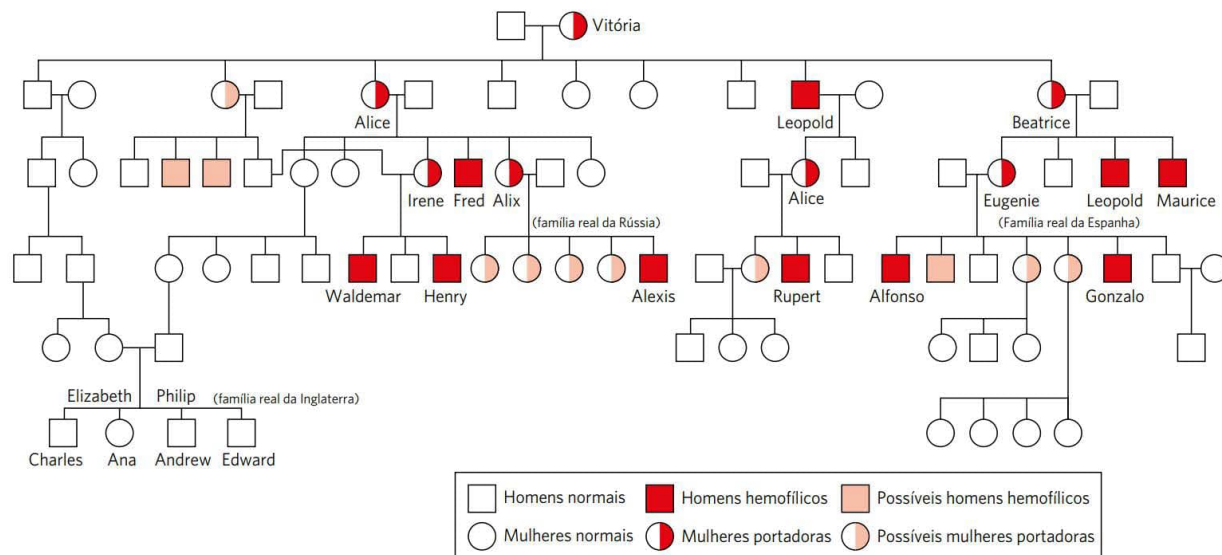


FIGURA 6-42 Famílias da realeza europeia e a herança da hemofilia A. Homens estão indicados por quadrados, e mulheres, por círculos. Homens acometidos de hemofilia estão representados por quadrados vermelhos, e as mulheres supostamente portadoras, por círculos em bege.

Algumas enzimas utilizam vários mecanismos regulatórios

A glicogênio-fosforilase catalisa a primeira reação da via que disponibiliza a glicose armazenada para a via do metabolismo dos carboidratos que produz energia (Capítulos 14 e 15). Essa é uma via metabólica muito importante, e a sua regulação é correspondentemente complexa. Embora a regulação primária da glicogênio-fosforilase ocorra por modificações covalentes, como foi resumido na Figura 6-37, a glicogênio-fosforilase é também modulada alostericamente, por AMP, que é um ativador da fosforilase *b*, por glicose-6-fosfato e ainda por ATP (ambos inibidores). Além disso, as

enzimas que adicionam ou removem grupos fosforila são elas próprias reguladas pelos níveis dos hormônios que regulam os níveis de açúcar no sangue; portanto, todo o sistema é sensível a esses hormônios (Figura 6-43; ver também Capítulos 15 e 23).

Outras enzimas com regulação complexa são encontradas em entroncamentos importantes de vias metabólicas. A glutamina-sintetase de bactérias, que catalisa a reação que introduz nitrogênio reduzido no metabolismo celular (Capítulo 22), está entre as enzimas com regulação mais complexa conhecida. Ela é regulada alostericamente (por ao menos oito moduladores diferentes), por modificações covalentes reversíveis e pela associação com outras proteínas regulató-

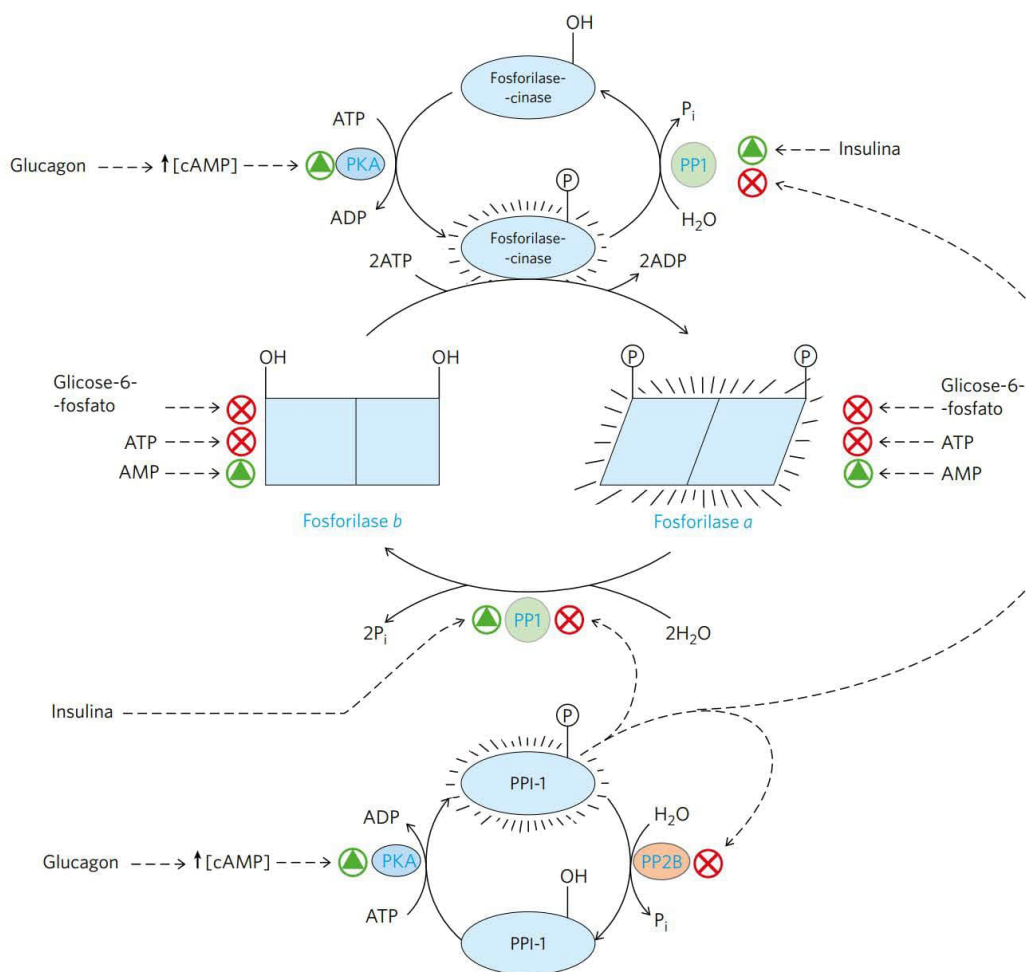


FIGURA 6-43 Regulação da atividade da glicogênio-fosforilase muscular por fosforilação. A atividade da glicogênio-fosforilase no músculo é sujeita a um sistema de regulação de vários níveis, envolvendo muito mais do que uma modificação covalente (fosforilação), como mostrado na Figura 6-37. Regulação alostérica e cascata regulatória sensível ao estado hormonal que age sobre enzimas envolvidas em fosforilação e desfosforilação também têm um papel importante. A atividade das duas formas da enzima é alostericamente regulada por um ativador (AMP) e por inibidores (glicose-6-fosfato e ATP) que se ligam na enzima a sítios independentes. As atividades da fosforilase-cinase e da fosforilase-fosfatase 1 (PP1) também são reguladas por modificações covalentes por uma via curta que responde aos hormônios glucagon e adrenalina. Um caminho leva à fosforilação da fosforilase-cinase e do inibidor da fosfoproteína-fosfatase 1 (PP1-1). A fosforilase-cinase fosforilada é ativada e, por sua vez, fosforila e ativa a glicogênio-fosforilase. Simultaneamente, a PP1-1 fosforilada interage com a PP1, inibindo-a. A PP1 também se mantém ativa (fosforilada) inibindo a fosfoproteína-fosfatase 2B (PP2B), a enzima que a desfosforila (inativando-a). Dessa maneira, o equilíbrio entre as formas *a* e *b* da glicogênio-fosforilase muda decisivamente na direção da glicogênio-fosforilase *a*, que é mais ativa. É importante ressaltar que ambas as formas da fosforilase-cinase são ativadas em certo grau pelo ion Ca^{2+} (não mostrado). Esta via é discutida com mais detalhes nos Capítulos 14, 15 e 23.

rias, mecanismo que será examinado em detalhes quando for estudada a regulação de vias metabólicas específicas.

Qual é a vantagem de tamanha complexidade na regulação da atividade enzimática? Este capítulo foi iniciado enfatizando a importância fundamental da catálise para a existência da vida. O *controle* da catálise também é crucial para a vida. Se todas as possíveis reações de uma célula fossem catalisadas simultaneamente, as macromoléculas e os metabólitos seriam rapidamente degradados em formas químicas muito mais simples. Em vez disso, as células catalisam apenas as reações que necessitam em determinado momento. Quando há abundância de recursos químicos, as células sintetizam e armazenam glicose e outros metabólitos. Quando os recursos químicos são escassos, as células usam essas reservas como combustível para o metabolismo celular. A energia química é usada de forma econômica e parcelada nas várias vias metabólicas de acordo com as necessidades da célula. A disponibilidade de catalisadores poderosos e específicos para cada reação torna possível a regulação dessas reações. Isso, por sua vez, origina a complexa e altamente regulada sinfonia chamada vida.

RESUMO 6.5 Enzimas regulatórias

- A atividade das vias metabólicas nas células é regulada pelo controle da atividade de determinadas enzimas.
- A atividade das enzimas alostéricas é ajustada pela ligação reversível de um modulador em um sítio regulatório. O modulador pode ser o próprio substrato ou algum outro metabólito, sendo que os efeitos do modulador podem ser inibitórios ou estimulatórios. O comportamento cinético das enzimas alostéricas reflete interações cooperativas entre as subunidades da enzima.
- Outras enzimas regulatórias são moduladas por modificações covalentes de grupos funcionais específicos que são necessários para a atividade. A fosforilação de resíduos de determinados aminoácidos é uma maneira muito comum de regular a atividade de enzimas.
- Muitas enzimas proteolíticas são sintetizadas como precursores inativos, denominados zimogênios, que são ativados por hidrólise, a qual remove pequenos fragmentos peptídicos.
- A coagulação sanguínea é mediada por duas cascatas regulatórias interligadas de zimogênios ativados proteoliticamente.
- As enzimas em pontos de cruzamento importantes de vias metabólicas podem ser reguladas por combinações complexas de efetores, permitindo a coordenação das atividades de vias interconectadas.

Termos-chave

Termos em negrito estão definidos no glossário.

enzima 187	apoenzima 188
cofator 188	apoproteína 188
coenzima 188	sítio ativo 190
grupo prostético 188	substrato 190
holoenzima 188	estado fundamental 190

estado de transição 191	equação de Lineweaver-Burk 202
energia de ativação (ΔG^\ddagger) 191	constante de dissociação (K_d) 202
intermediário da reação 191	k_{cat} 203
etapa limitante da velocidade 191	número de renovação (turnover) 203
constante de equilíbrio (K_{eq}) 192	nomenclatura de Cleland 204
constante de velocidade 192	inibição reversível 207
energia de ligação (ΔG_b) 193	inibidor competitivo 207
especificidade 195	inibidor incompetitivo 208
ajuste induzido 196	inibidor misto 208
catálise acidobásica específica 197	inibição não competitiva 208
catálise geral acidobásica 197	inibidores irreversíveis 210
catálise covalente 197	inativadores suicidas 210
cinética enzimática 198	análogo do estado de transição 210
velocidade inicial, V_0 198	serina-proteases 215
V_{max} 199	enzima regulatória 225
estado pré-estacionário 200	enzima alostérica 225
estado estacionário 200	modulador alostérico (efetor alostérico) 225
cinética do estado estacionário 200	proteína-cinases 229
suposição do estado estacionário 200	proteína-fosfatases 229
constante de Michaelis (K_m) 201	zimogênio 230
equação de Michaelis-Menten 201	pró-proteínas (pró-enzimas) 231
cinética de Michaelis-Menten 201	cascata regulatória 232
	fibrinogênio 232
	fibrina 233
	trombina 233
	via intrínseca 233
	via extrínseca 233

Teste seu conhecimento

1. Preservando o sabor doce do milho O sabor doce do milho recém-colhido deve-se ao alto conteúdo de açúcar no grão. O milho comprado em mercados (vários dias depois de colhido) não é tão doce porque 50% do açúcar livre é convertido em amido no primeiro dia após a colheita. Para manter a doçura do milho fresco, depois de debulhado, ele pode ser imerso em água fervente por alguns minutos e, então, resfriado com água fria. O milho processado dessa maneira e mantido congelado mantém a doçura. Qual é a base bioquímica desse processo?

2. Concentração intracelular das enzimas Para ter uma ideia da concentração real das enzimas em uma célula bacteriana, suponha que o citosol da célula contém a mesma concentração de 1.000 enzimas diferentes e que cada proteína tenha uma massa molecular de 100.000. Suponha também que a célula bacteriana seja um cilindro (diâmetro de 1,0 μm , comprimento de 2,0 μm), que o citosol (gravidade específica de 1,20) tenha 20% (por peso) de proteínas solúveis e que as proteínas solúveis sejam constituídas apenas de enzimas. Calcule a concentração molar *média* de cada enzima nesta célula hipotética.

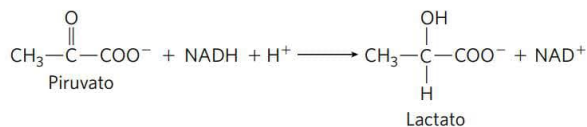
3. Aumento da velocidade pela urease A enzima urease aumenta a velocidade da hidrólise da ureia em pH 8,0 e 20°C por um fator de 10^{14} . Se uma dada quantidade de urease pode hidrolisar completamente certa quantidade de ureia em 5 minutos a 20°C e pH 8,0, quanto tempo levaria para que essa mesma quantidade de ureia fosse hidrolisada sob as mesmas condições na ausência de urease? Suponha que ambas as reações ocorram em sistemas estéreis, de modo que a ureia não possa ser atacada por bactérias.

4. Proteção das enzimas contra a desnaturação pelo calor Quando uma solução de enzima é aquecida, há perda progressiva da atividade catalítica com o tempo, devido à desnaturação da enzima. Uma solução da enzima hexocinase incubada a 45°C perde 50% da atividade em 12 minutos, mas, quando incubada a 45°C na presença de uma grande quantidade de um dos seus substratos, ela perde apenas 3% da atividade em 12 minutos. Sugira uma explicação para a desnaturação térmica da hexocinase ser retardada quando um dos seus substratos está presente.

5. Requisitos dos sítios ativos das enzimas A carboxipeptidase, que remove sequencialmente resíduos de aminoácidos carboxiterminais de substratos peptídicos, é um polipeptídeo único de 307 aminoácidos. Os dois grupos catalíticos essenciais do sítio ativo são fornecidos por Arg¹⁴⁵ e Glu²⁷⁰.

- Se a cadeia da carboxipeptidase fosse uma α -hélice perfeita, quão distante (em Å) o resíduo de Arg¹⁴⁵ estaria do resíduo de Glu²⁷⁰? (Dica: ver Figura 4-4a.)
- Explique como, então, esses dois resíduos de aminoácidos podem catalisar uma reação que ocorre em uma distância de poucos ângströms.

6. Ensaio quantitativo da lactato-desidrogenase A enzima muscular lactato-desidrogenase catalisa a reação



NADH e NAD⁺ são, respectivamente, a forma reduzida e a forma oxidada da coenzima NAD. Soluções de NADH, mas não de NAD⁺, absorvem luz em 340 nm. Essa propriedade é usada para determinar a concentração de NADH em solução medindo em espectrofotômetro, em 340 nm, a quantidade de luz absorvida pela solução. Explique como essas propriedades da NADH podem ser usadas para planejar um ensaio quantitativo da lactato-desidrogenase.

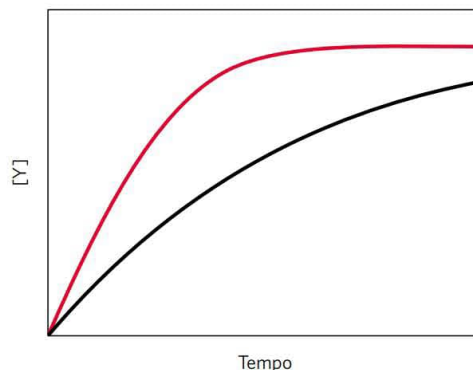
7. Efeito das enzimas sobre as reações Quais dos seguintes efeitos ocorreriam se uma enzima catalisasse a reação a seguir?



(a) Diminuindo a K'_{eq} ; (b) aumentando a k_1 ; (c) aumentando a k_2 ; (d) aumentando ΔG^\ddagger ; (e) diminuindo ΔG^\ddagger ; (f) um valor de ΔG° mais negativo; (g) aumentando k_2 .

8. Relações entre a velocidade da reação e a concentração do substrato: equação de Michaelis-Menten (a) Em que concentração de substrato uma enzima com k_{cat} de 30,0 s⁻¹ e K_m de 0,0050 M agiria com uma velocidade igual a um quarto da velocidade máxima?

- Determine a fração da $V_{\text{máx}}$ que seria obtida nas seguintes concentrações de substrato [S]: $\frac{1}{2} K_m$, $2 K_m$ e $10 K_m$.
- Uma enzima que catalisa essa reação foi isolada de uma espécie de bactéria. Essa enzima tem a mesma $V_{\text{máx}}$, mas K_m diferente para o substrato X. A enzima A tem K_m de 2,0 μM e a enzima B tem K_m de 0,5 μM . O gráfico a seguir apresenta a cinética da reação das duas enzimas com a mesma concentração de [X] = 1 μM . Qual curva corresponde a cada enzima?



9. Aplicação da equação I de Michaelis-Menten Uma enzima catalisa a reação $\text{A} \rightleftharpoons \text{B}$. A enzima está presente em uma concentração de 2 nM e a $V_{\text{máx}}$ é 1,2 $\mu\text{M s}^{-1}$. A K_m para o substrato A é 10 μM . Calcule a V_0 da reação quando a concentração do substrato for (a) 2 μM , (b) 10 μM , (c) 30 μM .

10. Aplicação da equação II de Michaelis-Menten Uma enzima catalisa a reação $\text{M} \rightleftharpoons \text{N}$. A enzima está presente na concentração de 1 nM e a $V_{\text{máx}}$ é 2 $\mu\text{M s}^{-1}$. A K_m para o substrato M é 4 μM . (a) Calcular k_{cat} . (b) Quais valores de $V_{\text{máx}}$ e K_m seriam observados se a reação ocorresse na presença de quantidade suficiente de um inibidor incompetitivo que gerasse um α' de 2,0?

11. Aplicação da equação II de Michaelis-Menten Um grupo de pesquisadores descobriu uma nova versão da felicidade, que eles denominaram de felicidade, que catalisa a reação química FELICIDADE \rightleftharpoons TRISTEZA. Os pesquisadores iniciaram a caracterização da enzima.

- No primeiro experimento, com [E]₀ de 4 nM, eles verificaram que a $V_{\text{máx}}$ é 1,6 $\mu\text{M s}^{-1}$. Com base nesse experimento, qual é o k_{cat} da felicidade*? (Coloque as unidades apropriadas.)
- Em outro experimento, com [E]₀ de 1 nM e [FELICIDADE] de 30 μM , os pesquisadores verificaram que $V_0 = 300 \text{ nM s}^{-1}$. Qual a K_m medida para a felicidade* para o substrato FELICIDADE? (Coloque as unidades apropriadas.)
- Pesquisas posteriores mostraram que a felicidade* purificada que foi usada no primeiro experimento estava contaminada com um inibidor reversível denominado RAIVA. Quando RAIVA foi totalmente removida da preparação e os dois experimentos foram repetidos, o valor de $V_{\text{máx}}$ medido em (a) aumentou para 4,8 $\mu\text{M s}^{-1}$ e o valor de K_m em (b) passou a ser 15 μM . Calcule os valores de α e α' para o inibidor RAIVA.
- Com base nas informações dadas, qual é o tipo da inibição por RAIVA?

12. Aplicação da equação II de Michaelis-Menten Outra enzima foi encontrada e ela catalisa a reação $\text{X} \rightleftharpoons \text{Y}$. Os pesquisadores verificaram que o valor de K_m para o substrato X é 4 μM e o k_{cat} é 20 min⁻¹.

- (a) Em um determinado experimento, $[X] = 6 \text{ mM}$ e $V_0 = 480 \text{ nM min}^{-1}$. Qual foi a $[E_0]$ usada nesse experimento?
- (b) Em outro experimento, $[E_0] = 0,5 \text{ } \mu\text{M}$, a V_0 medida foi de $5 \text{ } \mu\text{M min}^{-1}$. Qual foi a $[X]$ usada nesse experimento?
- (c) Foi verificado que o composto Z é um inibidor competitivo muito potente dessa enzima, com α de 10. Em um experimento com a mesma $[E_0]$ que foi usada em (a), mas com $[X]$ diferente, foi adicionada uma quantidade de Z que reduziu a velocidade máxima para V_0 a 240 nM min^{-1} . Qual a $[X]$ usada nesse experimento?
- (d) Com base nos parâmetros cinéticos dados, pode-se concluir que essa enzima evoluiu atingindo a perfeição catalítica? Explique brevemente a resposta usando o(s) parâmetro(s) cinético(s) que define(m) a perfeição catalítica.

13. Estimativa da $V_{\text{máx}}$ e da K_m por inspeção direta

Embora haja disponibilidade de métodos gráficos para a determinação precisa da $V_{\text{máx}}$ e da K_m de uma reação catalisada por enzimas (ver Quadro 6-1), algumas vezes essas grandezas podem ser rapidamente estimadas pelo exame dos valores de V_0 aumentando $[S]$. Estime os valores de $V_{\text{máx}}$ e de K_m da reação catalisada por enzima na qual foram obtidos os seguintes dados:

$[S] \text{ (M)}$	$V_0 \text{ (}\mu\text{M/min)}$
$2,5 \times 10^{-6}$	28
$4,0 \times 10^{-6}$	40
1×10^{-5}	70
2×10^{-5}	95
4×10^{-5}	112
1×10^{-4}	128
2×10^{-3}	139
1×10^{-2}	140

14. Propriedades de uma enzima da via de síntese de prostaglandinas

As prostaglandinas pertencem a uma classe de eicosanoides (derivados de ácidos graxos com um grande número de ações extremamente potentes sobre os tecidos de vertebrados). Elas são responsáveis pela produção de febre, inflamação e dores associadas. As prostaglandinas são derivadas do ácido araquidônico, um ácido graxo de 20 carbonos, por uma reação catalisada pela enzima prostaglandina-endoperoxído-sintase. Essa enzima, uma cicloxigenase, utiliza oxigênio para converter ácido araquidônico em PGG_2 , o precursor direto de muitas prostaglandinas diferentes (a síntese das prostaglandinas está descrita no Capítulo 21).

- (a) Os dados cinéticos abaixo são de uma reação catalisada pela prostaglandina-endoperoxído-sintase. Focando nas primeiras duas colunas, determine a $V_{\text{máx}}$ e a K_m da enzima.

Ácido araquidônico (mM)	Velocidade da formação de PGG_2 (mM min ⁻¹)	Velocidade de formação de PGG_2 com 10 mg/mL de ibuprofeno (mM min ⁻¹)
0,5	23,5	16,67
1,0	32,2	25,25
1,5	36,9	30,49
2,5	41,8	37,04
3,5	44,0	38,91

- (b) Ibuprofeno é um inibidor da prostaglandina-endoperoxído-sintase. Ao inibir a síntese das prostaglandinas, o ibuprofeno reduz a inflamação e a dor. Utilizando os dados da primeira e da terceira coluna da tabela acima, determine o tipo de inibição que o ibuprofeno provoca na endoperoxído-sintase.

15. Análise gráfica da $V_{\text{máx}}$ e da K_m Os seguintes dados foram obtidos em experimentos feitos durante um estudo sobre a atividade de uma peptidase intestinal sobre o substrato glicilglicina.

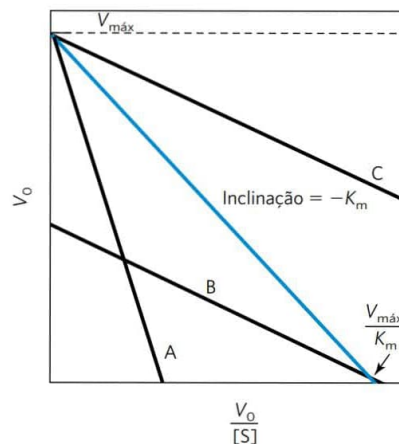
$[S] \text{ (mM)}$	Produto formado ($\mu\text{mol/min}^{-1}$)
1,5	0,21
2,0	0,24
3,0	0,28
4,0	0,33
8,0	0,40
16,0	0,45

Utilize análise gráfica (ver Quadro 6-1) para determinar a $V_{\text{máx}}$ e a K_m para esta preparação enzimática e o substrato.

16. Equação de Eadie-Hofstee Existem várias maneiras de transformar a equação de Michaelis-Menten e fazer gráficos com os dados para calcular os parâmetros cinéticos, cada uma delas com diferentes vantagens, dependendo do conjunto de dados a ser analisado. Uma das transformações da equação de Michaelis-Menten é a equação de Lineweaver-Burk, ou de duplo-recíproco. Multiplicando ambos os lados da equação de Lineweaver-Burk por $V_{\text{máx}}$ e rearranjando, obtém-se a equação de Eadie-Hofstee:

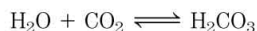
$$V_0 = (-K_m) \frac{V_0}{[S]} + V_{\text{máx}}$$

Um gráfico de V_0 versus $V_0/[S]$ para uma reação catalisada por uma enzima está mostrado a seguir. A curva azul foi obtida na ausência de inibidor. Qual das outras curvas (A, B ou C) mostra a atividade da enzima quando um inibidor competitivo é adicionado à mistura de reação? Dica: ver Equação 6-30.



17. O número de renovação da anidrase carbônica

A anidrase carbônica dos eritrócitos (M_r 30.000) tem um dos números de renovação mais altos conhecidos. Ela catalisa a hidratação reversível do CO_2 :



Este é um processo importante no transporte de CO_2 dos tecidos para os pulmões. Se na $V_{\text{máx}}$ 10,0 μg de anidrase carbônica pura catalisa a hidratação de 0,30 g de CO_2 em 1 min a 37°C , qual é o número de renovação (k_{cat}) da anidrase carbônica (em unidades de min^{-1})?

18. Dedução da equação de equilíbrio da inibição competitiva A equação de velocidade de uma enzima sujeita à inibição competitiva é

$$V_0 = \frac{V_{\text{máx}}[S]}{\alpha K_m + [S]}$$

Iniciando com uma nova definição de enzima total como

$$[E_t] = [E] + [ES] + [EI]$$

e as definições de α e K_i fornecidas no texto, deduza a equação de velocidade acima. Use a derivação da equação de Michaelis-Menten como um guia.

19. Inibição irreversível das enzimas Muitas enzimas são inibidas irreversivelmente por íons de metais pesados, como Hg^{2+} , Cu^{2+} ou Ag^+ , que podem reagir com grupos sulfidril para formar mercaptanas:

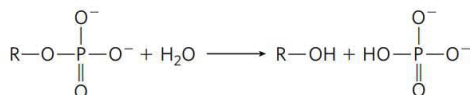


A afinidade de Ag^+ por grupos sulfidril é tão grande que Ag^+ pode ser utilizado para titular quantitativamente grupos —SH . Um pesquisador adicionou, a 10,0 mL de uma solução contendo enzima pura na concentração de 1,0 mg/mL, AgNO_3 suficiente para inativar completamente uma enzima. Foi necessário um total de 0,342 μmol de AgNO_3 . Calcule a massa molecular mínima da enzima. Por que o valor obtido dessa maneira pode dar apenas a massa molecular *mínima*?



20. Aplicações clínicas de diferentes inibidores de enzimas

O soro humano contém uma classe de enzimas conhecidas como fosfatases ácidas. Elas hidrolisam ésteres de fosfato biológicos sob condições levemente ácidas (pH 5,0):



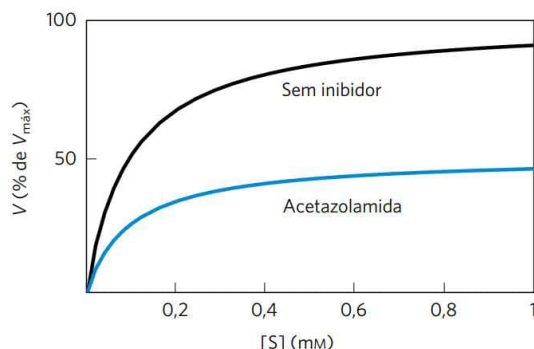
Fosfatases ácidas são produzidas por eritrócitos, fígado, rins, baço e próstata. A enzima da próstata tem importância clínica, uma vez que um aumento da sua atividade no sangue pode ser um indício de câncer de próstata. A fosfatase da próstata é inibida fortemente pelo íon tartarato, ao passo que as fosfatases dos outros tecidos, não. Como essa informação pode ser usada para desenvolver uma metodologia para medir a atividade da fosfatase ácida prostática no sangue?



21. Inibição da anidrase carbônica por acetazolamida

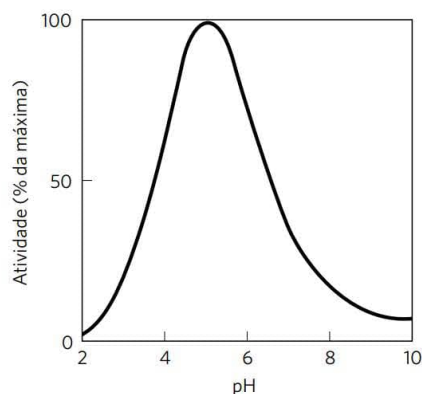
A anidrase carbônica é fortemente inibida pelo fármaco acetazolamida, utilizado como diurético (i.e., para aumentar a produção de urina) e para diminuir a pressão excessivamente alta no olho (devido ao acúmulo de fluido intraocular) no glaucoma. A anidrase carbônica tem um papel importante nesse e em outros processos de secreção, pois participa na regulação do pH e do conteúdo de bicarbonato de vários

fluidos corporais. A curva experimental da velocidade inicial (como porcentagem da $V_{\text{máx}}$) dessa reação da anidrase carbônica *versus* [S] está ilustrada abaixo (curva superior). Quando o experimento é repetido na presença de acetazolamida, é obtida a curva inferior. A partir da inspeção das duas curvas e do seu conhecimento das propriedades cinéticas de inibidores competitivos e mistos, determine a natureza da inibição por acetazolamida. Explique o raciocínio utilizado.



22. Efeitos dos inibidores reversíveis Deduza a expressão para o efeito de um inibidor reversível sobre a K_m (K_m aparente = $\alpha K_m / \alpha'$). Inicie com a Equação 6-30 e a assertiva de que a K_m equivale à [S] na qual $V_0 = V_{\text{máx}}/2\alpha'$.

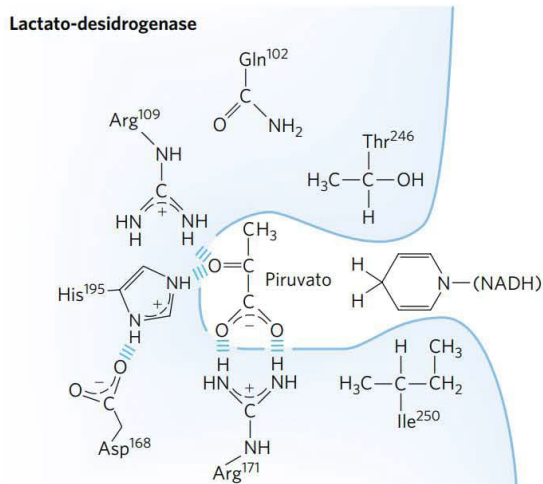
23. pH Ótimo da lisozima O sítio ativo da lisozima contém dois resíduos de aminoácidos essenciais para a catálise: Glu³⁵ e Asp⁵². Os valores de pK_a das carboxilas das cadeias laterais desses resíduos são 5,9 e 4,5, respectivamente. Qual é o estado de ionização (protonado ou desprotonado) de cada resíduo em pH 5,2, o pH ótimo da lisozima? Como os estados de ionização desses resíduos podem explicar o perfil pH-atividade da lisozima mostrado a seguir?



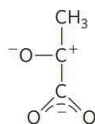
Problema de análise de dados

24. Explorando e modificando a lactato-desidrogenase O exame da estrutura de uma enzima pode levar à proposição de hipóteses sobre a relação entre os diferentes aminoácidos presentes na estrutura da proteína e a função proteica. Uma maneira de testar essas hipóteses é usar a tecnologia do DNA recombinante para gerar versões mutantes da enzima e, então, examinar a estrutura e a função dessas formas alteradas. A tecnologia utilizada para isso está descrita nos Capítulos 8 e 9.

Um exemplo desse tipo de análise é o trabalho de A. R. Clarke e colaboradores sobre a enzima lactato-desidrogenase, publicado em 1989. A lactato-desidrogenase (LDH) catalisa a redução do piruvato por NADH, formando lactato (ver Seção 14.3). Um esquema do sítio ativo da enzima está mostrado a seguir, com o piruvato no centro.



O mecanismo de reação é similar a muitas outras reduções de NADH (Figura 13-24). De maneira geral, ele é o inverso das etapas 2 e 3 mostradas na Figura 14-8. O estado de transição envolve um grupo carbonila altamente polarizado na molécula de piruvato:



- (a) Uma forma mutante da LDH na qual a Arg¹⁰⁹ foi substituída por Gln apresenta apenas 5% da ligação ao piruvato e 0,07% da atividade da enzima do tipo selvagem. Elabore uma explicação plausível para os efeitos dessa mutação.

- (b) A forma mutante da LDH na qual a Arg¹⁷¹ foi substituída por Lys apresenta apenas 0,05% do nível de ligação ao substrato da enzima do tipo selvagem. Por que esse drástico efeito causa surpresa?
- (c) Na estrutura cristalina da LDH, o grupo guanidino da Arg¹⁷¹ e o grupo carboxila do piruvato são alinhados em uma configuração bifurcada coplanar, como mostrado. Com base nessa informação, elabore uma explicação plausível para o efeito dramático da substituição da Arg¹⁷¹ por Lys.
- (d) Uma forma mutante da LDH na qual a Ile²⁵⁰ foi substituída por Gln mostra uma ligação diminuída com NADH. Elabore uma explicação plausível para esse resultado.

Clarke e colaboradores também prepararam uma versão mutante da LDH que ligaria e reduziria o oxalacetato no lugar do piruvato. Eles fizeram uma única substituição, trocando Gln¹⁰² por Arg. A enzima resultante reduz oxalacetato a malato e não consegue mais reduzir piruvato a lactato. Portanto, a LDH é convertida em malato-desidrogenase.

- (e) Faça um esquema do sítio ativo deste mutante da LDH com oxalacetato ligado.
- (f) Por que essa enzima mutante usa agora oxalacetato como substrato em vez de piruvato?
- (g) Os autores ficaram surpresos com o fato de que a substituição por um aminoácido maior no sítio ativo possibilita a ligação de um substrato maior. Formule uma explicação plausível para esse resultado.

Referências

- Clarke, A.R., T. Atkinson e J.J. Holbrook. 1989. From analysis to synthesis: new ligand binding sites on the lactate dehydrogenase framework, Part I. *Trends Biochem. Sci.* 14:101–105.
- Clarke, A.R., T. Atkinson e J.J. Holbrook. 1989. From analysis to synthesis: new ligand binding sites on the lactate dehydrogenase framework, Part II. *Trends Biochem. Sci.* 14:145–148.

Carboidratos e glicobiologia

- 7.1 Monossacarídeos e dissacarídeos 241
- 7.2 Polissacarídeos 252
- 7.3 Glicoconjugados: proteoglicanos, glicoproteínas e glicoesfingolipídeos 261
- 7.4 Carboidratos como moléculas informativas: o código dos açúcares 267
- 7.5 Trabalhando com carboidratos 272

Os carboidratos são as biomoléculas mais abundantes na Terra. A cada ano, a fotossíntese converte mais de 100 bilhões de toneladas de CO_2 e H_2O em celulose e outros produtos vegetais. Alguns carboidratos (açúcar e amido) são os principais elementos da dieta em muitas partes do mundo, e sua oxidação é a principal via de produção de energia na maioria das células não fotossintéticas. Polímeros de carboidratos (também chamados de glicanos) agem como elementos estruturais e protetores nas paredes celulares bacterianas e vegetais e nos tecidos conectivos dos animais. Outros polímeros de carboidratos lubrificam as articulações e auxiliam o reconhecimento e a adesão intercelular. Polímeros de carboidratos complexos, ligados covalentemente a proteínas ou lipídeos, atuam como sinais que determinam a localização intracelular ou o destino metabólico dessas moléculas híbridas, chamadas de **glicoconjugados**. Este capítulo apresenta as principais classes de carboidratos e glicoconjugados e traz alguns exemplos de seus muitos papéis estruturais e funcionais.

Carboidratos são poli-hidroxialdeídos ou poli-hidroxi-cetonas, ou substâncias que geram esses compostos quando hidrolisadas. Muitos carboidratos têm a fórmula empírica $(\text{CH}_2\text{O})_n$; alguns também contêm nitrogênio, fósforo ou enxofre. Existem três classes principais de carboidratos: monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos (a palavra “sacarídeo” é derivada do grego *sakcharon*, que significa “açúcar”). Os **monossacarídeos**, ou açúcares simples, são constituídos por uma única unidade poli-hidroxicetona ou poli-hidroxialdeído. O monossacarídeo mais abundante na natureza é o açúcar de 6 carbonos D-glicose, algumas vezes chamado de dextrose. Monossacarídeos de quatro ou mais carbonos tendem a formar estruturas cíclicas.

Os **oligossacarídeos** consistem em cadeias curtas de unidades de monossacarídeos, ou resíduos, unidas

por ligações características, chamadas de ligações glicosídicas. Os mais abundantes são os **dissacarídeos**, com duas unidades de monossacarídeos. A sacarose (açúcar de cana), por exemplo, é um dissacarídeo constituído pelos açúcares de seis carbonos D-glicose e D-frutose. Todos os monossacarídeos e dissacarídeos comuns têm nomes terminados com o sufixo “-ose”. Nas células, a maioria dos oligossacarídeos constituídos por três ou mais unidades não ocorrem como moléculas livres, mas são ligados a moléculas que não são açúcares (lipídeos ou proteínas), formando glicoconjugados.

Os **polissacarídeos** são polímeros de açúcar que contêm mais de 20 unidades de monossacarídeos; alguns têm centenas ou milhares de unidades. Alguns polissacarídeos, como a celulose, têm cadeias lineares; outros, como o glicogênio, são ramificados. Ambos, celulose e glicogênio, são formados por unidades repetidas de D-glicose, mas diferem no tipo de ligação glicosídica e, em consequência, têm propriedades e funções biológicas notavelmente diferentes.

7.1 Monossacarídeos e dissacarídeos

Os mais simples dos carboidratos, os monossacarídeos, são aldeídos ou cetonas com dois ou mais grupos hidroxila; glicose e frutose, monossacarídeos de seis carbonos, têm cinco grupos hidroxila. Muitos dos átomos de carbono aos quais os grupos hidroxila estão ligados são centros quirais, o que origina os muitos estereoisômeros de açúcares encontrados na natureza. Essa estereoisomeria é biologicamente importante porque as enzimas que agem sobre os açúcares são absolutamente estereoespecíficas, normalmente preferindo um estereoisômero a outro por três ou mais ordens de magnitude, como demonstrado pelos seus valores de K_m ou constantes de ligação. É tão difícil encaixar o estereoisômero errado dentro do sítio de ligação de uma enzima quanto é difícil colocar a sua luva esquerda na sua mão direita.

Inicialmente, descreveremos as famílias de monossacarídeos com esqueletos de três a sete carbonos – suas estruturas, as formas estereoisoméricas e os meios para representar as estruturas tridimensionais no papel. Depois serão discutidas algumas reações químicas dos grupos carbonila dos monossacarídeos. Uma dessas reações, a adição de um grupo hidroxila que é parte da mesma molécula, gera formas cíclicas com esqueletos de quatro ou mais carbonos (as formas que predominam em solução aquosa). O fechamento

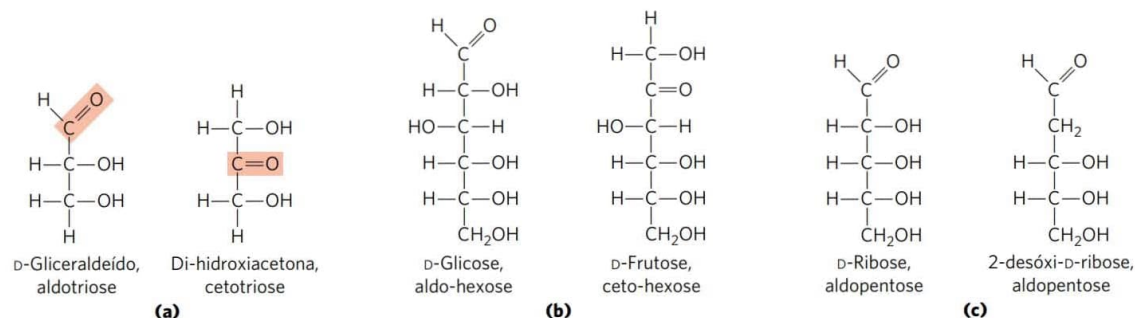


FIGURA 7-1 Monossacarídeos representativos. (a) Duas trioses, uma aldose e uma cetose. O grupo carbonila em cada molécula está sombreado. (b) Duas hexoses comuns. (c) As pentoses componentes de ácidos nucleicos. A D-ribose é um componente do ácido ribonucleico (RNA) e a 2-desóxi-D-ribose é um componente do ácido desoxirribonucleico (DNA).

desse anel cria um novo centro quiral, adicionando ainda mais complexidade a essa classe de compostos. A nomenclatura para especificar sem ambiguidades a configuração de cada átomo de carbono em uma forma cíclica e os meios para representar essas estruturas no papel serão, portanto, descritos com alguns detalhes; essas informações serão úteis quando for discutido o metabolismo dos monossacarídeos na Parte II deste livro. Serão apresentados também alguns importantes derivados de monossacarídeos encontrados em capítulos posteriores.

As duas famílias de monossacarídeos são as aldoses e as cetoses

Os monossacarídeos são sólidos cristalinos e incolores plenamente solúveis em água, mas insolúveis em solventes apolares. A maioria tem sabor adocicado (ver Quadro 7-2, p. 252). Os esqueletos dos monossacarídeos comuns são compostos por cadeias de carbonos não ramificadas, nas quais todos os átomos de carbono estão unidos por ligações simples. Nessa forma de cadeia aberta, um dos átomos de carbono está ligado duplamente a um átomo de oxigênio, formando um grupo carbonila; os outros átomos de carbono estão ligados, cada um, a um grupo hidroxila. Quando o grupo carbonila está na extremidade da cadeia de carbonos (i.e., em um grupo aldeído), o monossacarídeo é uma **aldose**; quando o grupo carbonila está em qualquer outra posição (em um grupo cetona), o monossacarídeo é uma **cetose**. Os monossacarídeos mais simples são as duas trioses de três carbonos: gliceraldeído (aldotriose) e di-hidroxiacetona (cetotriose, ver **Figura 7-1a**).

Monossacarídeos com quatro, cinco, seis e sete átomos de carbono no esqueleto são chamados, respectivamente, de tetroses, pentoses, hexoses e heptoses. Existem aldoses e cetoses para cada um desses comprimentos de cadeia: aldotetroses e cetotetroses, aldopentoses e cetopentoses, e assim por diante. As hexoses, que incluem a aldo-hexose D-glicose e a ceto-hexose D-frutose (**Figura 7-1b**), são os monossacarídeos mais comuns na natureza – os produtos da fotossíntese e os intermediários-chave das sequências centrais de reações produtoras de energia da maioria dos organismos. As aldopentoses D-ribose e 2-desóxi-D-ribose (**Figura 7-1c**) são componentes dos nucleotídeos e dos ácidos nucleicos (Capítulo 8).

Monossacarídeos têm centros assimétricos

Todos os monossacarídeos, com exceção da di-hidroxiacetona, contêm um ou mais átomos de carbono assimétricos (quirais) e, portanto, ocorrem em formas isoméricas opticamente ativas (pp. 17-18). A aldose mais simples, o gliceraldeído, contém um centro quiral (o átomo de carbono central) e, assim, tem dois isômeros ópticos diferentes, ou **enantiômeros** (**Figura 7-2**).

>> Convenção-chave: um dos dois enantiômeros do gliceraldeído é, por convenção, designado isômero D, e o outro é isômero L. Assim como para outras biomoléculas com centros quirais, as configurações absolutas dos açúcares são conhecidas a partir de cristalografia por raios X. Para representar estruturas tridimensionais de açúcares no papel, em geral são utilizadas as **fórmulas de projeção de Fischer** (**Figura 7-2**). Nas fórmulas de projeção de Fischer, as ligações horizontais projetam-se para fora do plano do papel, em direção ao leitor; as ligações verticais projetam-se para trás do plano do papel, distanciando-se do leitor. ◀◀

Em geral, uma molécula com n centros quirais pode ter 2^n estereoisômeros. O gliceraldeído tem $2^1 = 2$; as aldo-hexoses, com quatro centros quirais, têm $2^4 = 16$. Para cada um dos comprimentos de cadeia carbônica, os estereoisômeros dos monossacarídeos podem ser divididos em dois grupos, os quais diferem quanto à configuração do centro quiral *mais distante* do carbono da carbonila. Aqueles nos quais a configuração desse carbono de referência é a mesma daquela do D-gliceraldeído são designados isômeros D, e aqueles com a mesma configuração do L-gliceraldeído são isômeros L. Em outras palavras, quando o grupo hidroxila do carbono de referência está à direita (*dextro*) em uma fórmula de projeção que apresenta o carbono da carbonila no topo, o açúcar é o isômero D; quando está à esquerda (*levo*), é o isômero L.* Das 16 aldo-hexoses possíveis, oito estão na forma D e oito na forma L. Em sua maioria, as hexoses dos organismos vivos são isômeros D. Por que isômeros D? Uma questão interessante, e sem resposta. Lembre-se

*N. de T. Não confundir com os isômeros D (ou +) e L (ou -) (em letras minúsculas), que designam para qual lado o isômero óptico desvia o plano da luz polarizada. Aqui, os isômeros D e L referem-se à disposição dos substituintes ao redor do carbono assimétrico mais distante da carbonila.

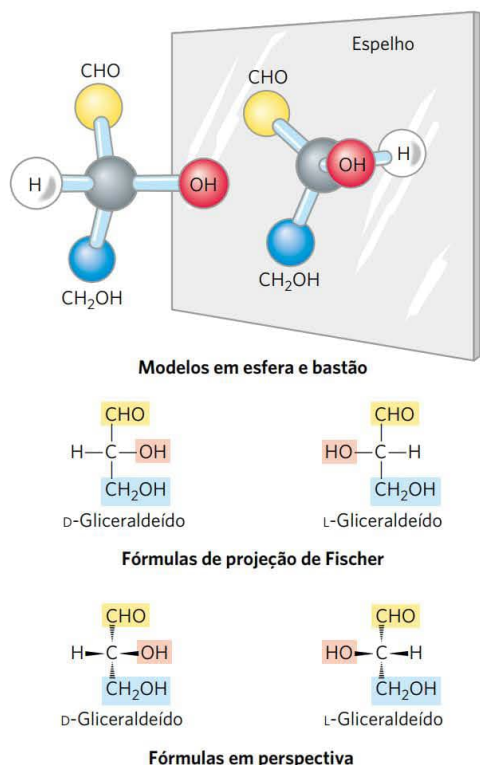


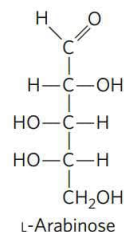
FIGURA 7-2 Três maneiras para representar os dois enantiômeros do gliceraldeído. Os enantiômeros são imagens especulares um do outro. Modelos de esfera e bastão mostram a verdadeira configuração das moléculas. Lembre-se que, nas fórmulas em perspectiva, a extremidade larga da cunha sólida projeta-se para fora do plano do papel, em direção ao leitor; na cunha descontinua, ela se estende para trás (ver Figura 1-19).

que todos os aminoácidos encontrados nas proteínas são exclusivamente um dos dois isômeros possíveis, no caso, L (p. 78). A base para essa preferência inicial por um dos isômeros durante a evolução também é desconhecida; entretanto, uma vez que um isômero tenha sido selecionado, é provável que as enzimas em evolução retenham a preferência por aquele estereoisômero.

A **Figura 7-3** apresenta as estruturas dos estereoisômeros D de todas as aldoses e cetoses que têm de três a seis átomos de carbono. Os carbonos de um açúcar começam a ser numerados a partir da extremidade da cadeia mais próxima ao grupo carbonila. Cada uma das oito D-aldo-hexoses, que diferem em estereoquímica em C-2, C-3 ou C-4, tem seu próprio nome: D-glicose, D-galactose, D-manose, e assim por diante (Figura 7-3a). As cetoses de quatro e cinco carbonos são nomeadas pela inserção de “ul” ao nome da aldose correspondente; por exemplo, D-ribulose é a cetopentose que corresponde à aldopentose D-ribose. (A importância da ribulose será discutida no estudo da fixação do CO_2 atmosférico pelas plantas, no Capítulo 20.) As cetohexoses são nomeadas de maneira diferente: por exemplo,

frutose (do latim, *fructus*, “fruto”; as frutas são uma das fontes desse açúcar) e sorbose (de *Sorbus*, o gênero da sorveira, planta cujos frutos são ricos no álcool sorbitol, derivado de açúcares). Dois açúcares que diferem apenas na configuração de um carbono são chamados de **epímeros**; D-glicose e D-manose, que diferem apenas na estequiometria do C-2, são epímeros em C2, assim como D-glicose e D-galactose (que diferem em C-4, ver **Figura 7-4**), que são epímeros em C4.

Alguns açúcares ocorrem naturalmente na forma L; exemplos são L-arabinose e os isômeros L de alguns derivados de açúcar que comumente compõem glicoconjugados (Seção 7.3).

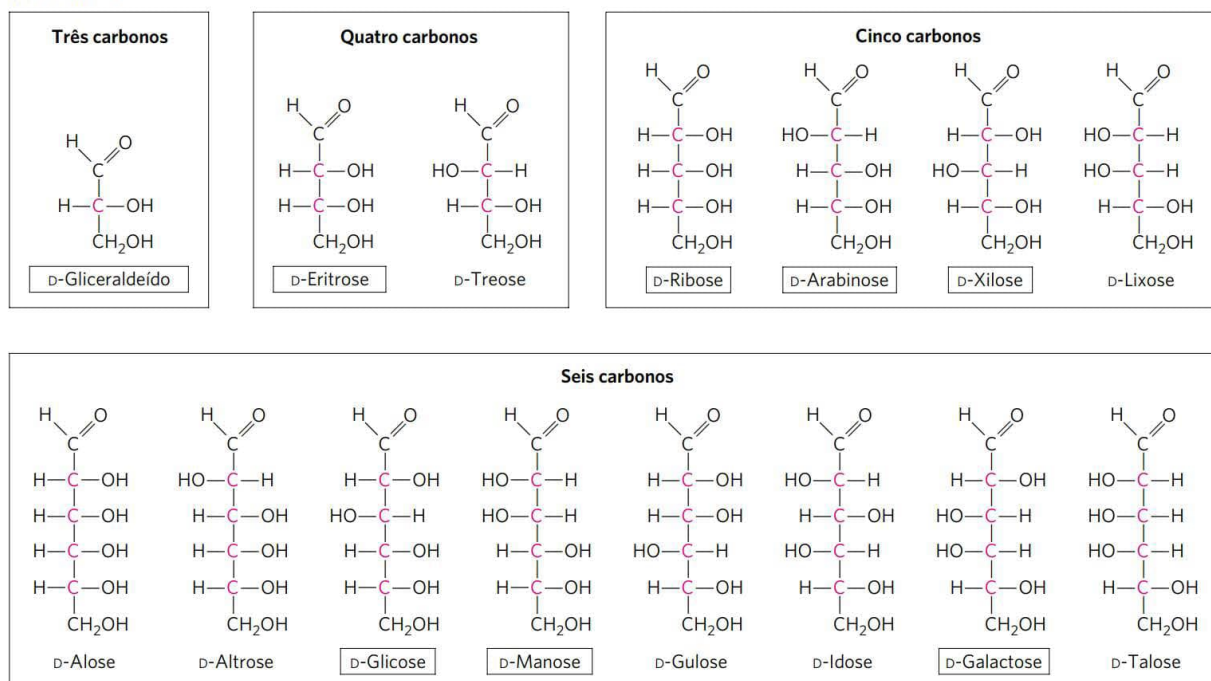


Os monossacarídeos comuns têm estruturas cíclicas

Por simplicidade, até este momento foram representadas as estruturas de aldoses e cetoses como moléculas de cadeia aberta (Figuras 7-3 e 7-4). Na verdade, em solução aquosa, as aldotetroses e todos os monossacarídeos com cinco ou mais átomos de carbono no esqueleto ocorrem predominantemente como estruturas cíclicas (em anel), nas quais o grupo carbonila está formando uma ligação covalente com o oxigênio de um grupo hidroxila presente na cadeia. A formação dessas estruturas em anel é o resultado de uma reação geral entre alcoóis e aldeídos ou cetonas para formar derivados, chamados de **hemiacetais** ou **hemicetais**. Duas moléculas de um álcool podem ser adicionadas ao carbono da carbonila; o produto da primeira adição é um hemiacetal (quando adicionado a uma aldose) ou um hemicetal (quando adicionado a uma cetose). Se os grupos —OH e carbonila vierem da mesma molécula, o resultado será um anel com cinco ou seis membros. A adição de uma segunda molécula de álcool produz o acetal ou cetal completo (**Figura 7-5**), e a ligação formada é uma ligação glicosídica. Quando as duas moléculas que reagem entre si forem monossacarídeos, o acetal ou cetal formado será um dissacarídeo.

A reação com a primeira molécula de álcool cria um centro quiral adicional (o carbono da carbonila). Como o álcool pode ser adicionado de duas maneiras diferentes, atacando a “frente” ou as “costas” do carbono da carbonila, a reação pode produzir qualquer uma de duas configurações estereoisoméricas, denominadas α e β . Por exemplo, a D-glicose ocorre em solução na forma de hemiacetal intramolecular, no qual o grupo hidroxila livre do C-5 reagiu com o C-1 do aldeído, tornando o carbono 1 assimétrico e produzindo dois possíveis estereoisômeros, designados α e β (**Figura 7-6**). As formas isoméricas de monossacarídeos que diferem apenas na configuração do átomo de carbono hemiacetal ou hemicetal são chamadas de **anômeros**, e o átomo de carbono da carbonila é chamado de **carbono anomérico**.

(a) D-Aldoses



(b) D-Cetoses

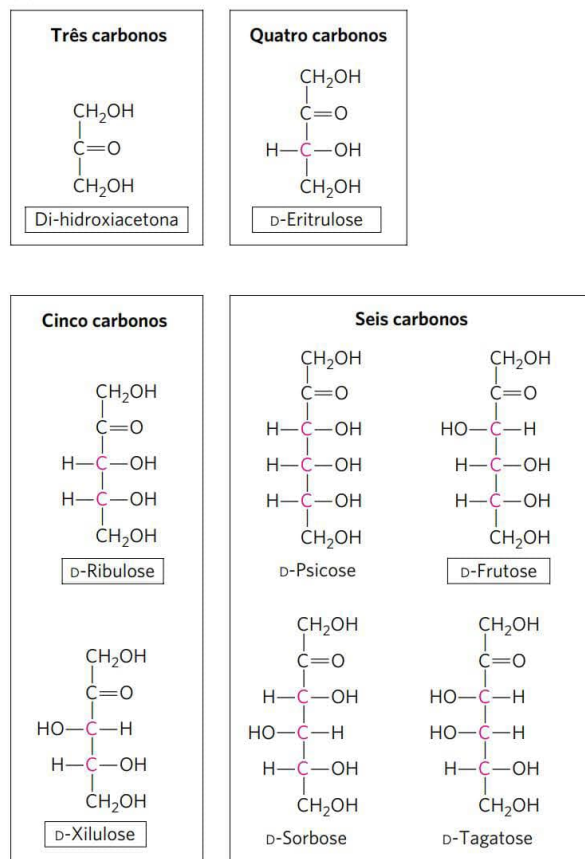


FIGURA 7-3 Aldoses e cetoses. As séries de (a) D-aldoses e (b) D-cetoses, contendo de 3 a 6 átomos de carbono, mostradas como fórmulas de projeção. Os átomos de carbono em vermelho são centros quirais. Em todos estes isômeros D, o carbono quiral *mais distante da carbonila* apresenta a mesma configuração do carbono quiral do D-gliceraldeído. Os açúcares com os nomes dentro de retângulos são os mais comuns na natureza; você os encontrará novamente neste capítulo e em capítulos posteriores.

Os compostos com anéis de seis membros são chamados de **piranoses**, pois se assemelham ao composto pirano, que forma um anel de seis membros (**Figura 7-7**). Os nomes sistemáticos para as duas formas em anel da D-glicose são α -D-glicopiranosose e β -D-glicopiranosose. As cetohexoses (como a frutose) também ocorrem como compostos cíclicos com formas anoméricas α e β . Nesses compostos, o grupo hidroxila em C-5 (ou C-6) reage com o grupo cetona em C-2 para formar um anel **furanose** (ou piranose), contendo uma ligação hemiacetal (**Figura 7-5**). A D-frutose forma facilmente o anel furanose (**Figura 7-7**); o anômero mais comum desse açúcar, seja em formas combinadas ou em derivados, é a β -D-frutofuranose.

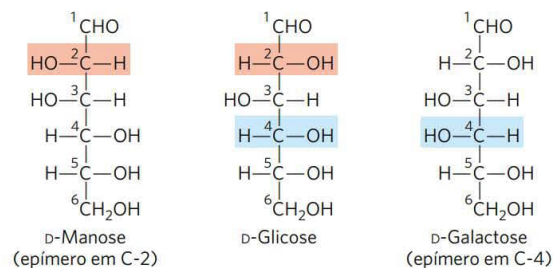


FIGURA 7-4 Epímeros. D-Glicose e dois de seus epímeros são mostrados como fórmulas de projeção. Cada epímero difere da D-glicose na configuração de um centro quiral (sombreado em cor salmão ou azul).

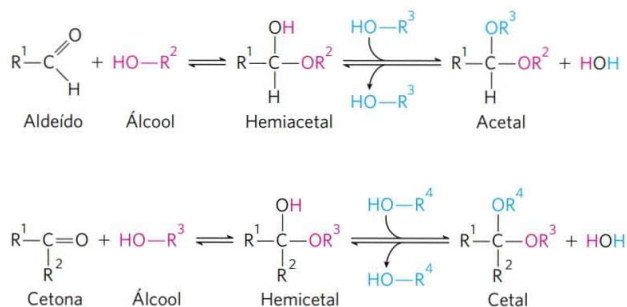


FIGURA 7-5 Formação de hemiacetais e hemicetais. Um aldeído ou uma cetona podem reagir com um álcool em uma razão de 1:1 para gerar um hemiacetal ou um hemicetal, respectivamente, criando um novo centro quiral no carbono da carbonila. A reação com uma segunda molécula de álcool produz um acetal ou um cetal. Quando o segundo álcool é parte de outra molécula de açúcar, a ligação produzida é uma ligação glicosídica.

As estruturas cíclicas dos açúcares são representadas mais corretamente pelas **fórmulas em perspectiva de Haworth** do que pelas projeções de Fisher comumente utilizadas para as estruturas de açúcares lineares. Nas projeções de Haworth, o anel de seis membros é inclinado para deixar seu plano quase perpendicular ao plano do papel, com as ligações mais próximas do leitor representadas por

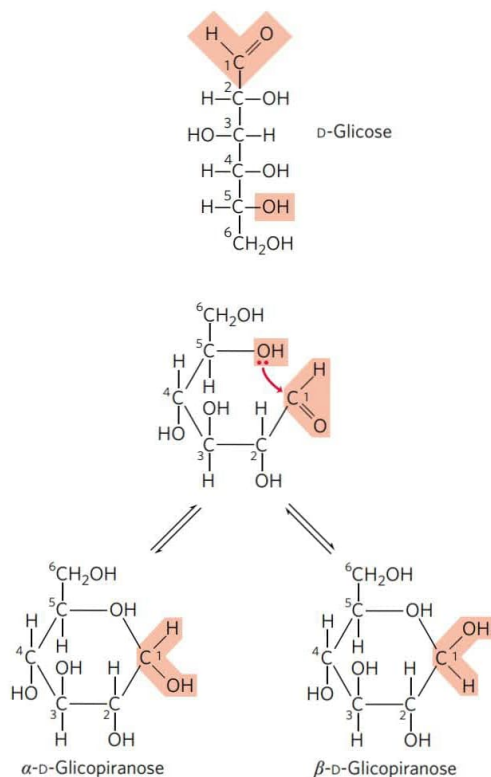


FIGURA 7-6 Formação das duas formas cíclicas da D-glicose. A reação entre o grupo aldeído em C-1 e o grupo hidroxila em C-5 forma uma ligação hemiacetal, produzindo um dos dois estereoisômeros, os anomeros α e β , que diferem apenas na estereoquímica ao redor do carbono hemiacetal. Esta reação é reversível. A interconversão dos anomeros α e β é chamada de mutarotação.

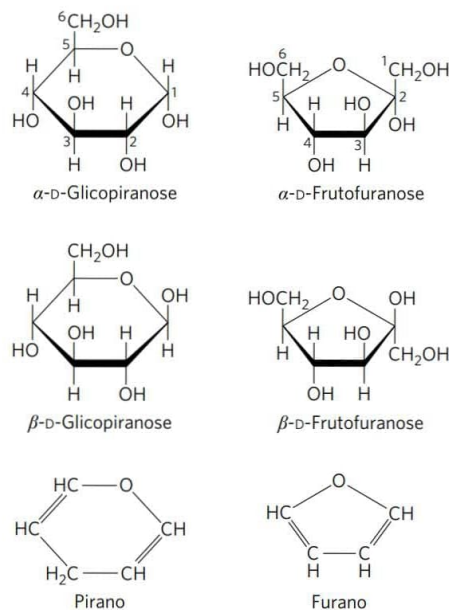
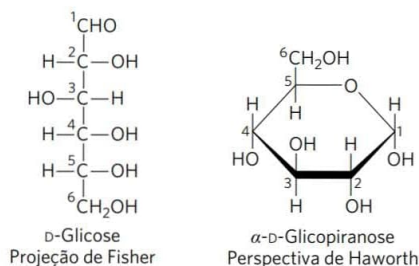


FIGURA 7-7 Piranoses e furanoses. As formas piranose da D-glicose e as formas furanose da D-frutose estão mostradas aqui como fórmulas em perspectiva de Haworth. Os limites do anel mais próximos ao leitor são representados por linhas mais grossas. Os grupos hidroxila abaixo do plano do anel nestas perspectivas de Haworth apareceriam à direita em uma projeção de Fischer (comparar com a Figura 7-6). Pirano e furano estão mostrados para comparações.

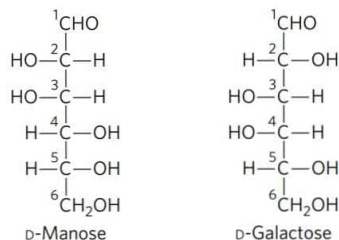
linhas mais grossas do que aquelas representando as ligações mais distantes, como na Figura 7-7.

>> Convenção-chave: para converter uma fórmula de projeção de Fisher de qualquer D-hexose linear em uma fórmula em perspectiva de Haworth mostrando a estrutura cíclica da molécula, desenhe o anel de seis membros (cinco carbonos e um oxigênio, na direita superior), numere os átomos no sentido horário, começando com o carbono anomérico, e, então, coloque os grupos hidroxila. Se um grupo hidroxila estiver à direita na projeção de Fisher, ele é colocado apontando para baixo (i.e., abaixo do plano do anel) na perspectiva de Haworth; se ele estiver à esquerda na projeção de Fisher, é colocado apontando para cima (i.e., acima do plano) na perspectiva de Haworth. O grupo $\text{—CH}_2\text{OH}$ terminal projeta-se para cima no enantiômero D, e para baixo no enantiômero L. A hidroxila no carbono anomérico pode apontar para cima ou para baixo. Quando a hidroxila do carbono anomérico de uma D-hexose estiver no mesmo lado do anel que o C-6, a estrutura é, por definição, β ; quando estiver do lado oposto do C-6, a estrutura é α .



PROBLEMA 7-1 Conversão de projeções de Fischer para fórmulas em perspectiva de Haworth

Desenhe as fórmulas em perspectiva de Haworth para D-manose e D-galactose.



Solução: as piranoses são anéis de seis membros, então comece com estruturas de Haworth de seis membros, com o átomo de oxigênio no topo à direita. Numere os átomos de carbono no sentido horário, começando com o carbono do grupo aldeído. Para a manose, coloque os grupos hidroxila nos C-2, C-3 e C-4 para cima, para cima e para baixo do anel, respectivamente (pois na projeção de Fischer elas estão no lado esquerdo, esquerdo e direito da estrutura da manose). Para a D-galactose, os grupos hidroxila estão orientados para baixo, para cima e para cima do anel em C-2, C-3 e C-4, respectivamente. A hidroxila em C-1 pode estar para cima ou para baixo; existem duas configurações possíveis, α e β , para este carbono.

PROBLEMA 7-2 Desenhando fórmulas em perspectiva de Haworth para isômeros de açúcares

Desenhe as fórmulas em perspectiva de Haworth para a α -D-manose e a β -L-galactose.

Solução: a fórmula em perspectiva de Haworth para a D-manose do Problema 7-1 pode ter o grupo hidroxila em C-1 apontando para cima ou para baixo. De acordo com a convenção-chave, para a forma α a hidroxila em C-1 aponta para baixo quando C-6 está para cima, como é o caso na D-manose.

Para a β -L-galactose, use a representação de Fischer para a D-galactose (ver Problema 7-1) para desenhar a representação de Fischer correta da L-galactose, que é sua imagem especular: as hidroxilas em C-2, C-3, C-4 e C-5 estão à esquerda, à direita, à direita e à esquerda, respectivamente. Agora desenhe a fórmula em perspectiva de Haworth, um anel de seis membros no qual os grupos —OH nos carbonos C-2, C-3 e C-4 estão orientados para cima, para baixo e para baixo, respectivamente, pois na representação de Fischer eles estão à esquerda, direita e direita. Como essa é a forma β , o —OH no carbono anomérico aponta para baixo (mesmo lado que C-5).

Os anômeros α e β da D-glicose se interconvertem em solução aquosa por um processo chamado de **mutarrotação**, no qual uma forma em anel (p. ex., o anômero α) se abre brevemente na forma linear, e, então, se fecha nova-

mente, produzindo o anômero β (Figura 7-6). Portanto, uma solução de α -D-glicose e uma solução de β -D-glicose formarão, ao final, misturas em equilíbrio idênticas, as quais têm propriedades ópticas idênticas. Essa mistura consiste em aproximadamente um terço de α -D-glicose, dois terços de β -D-glicose e quantidades muito pequenas das formas linear e em anel de cinco membros (glicofuranose).

Fórmulas em perspectiva de Haworth, como aquelas da Figura 7-7, são comumente utilizadas para mostrar a estereoquímica das formas em anel de monossacarídeos. Contudo, o anel de seis membros, piranose, não é planar, como a perspectiva de Haworth sugere, mas tende a assumir uma de duas conformações em “cadeira” (**Figura 7-8**). Lembre-se, do Capítulo 1 (pp. 16-19), em que duas *conformações* de uma molécula são interconvertíveis sem quebra de ligações covalentes, ao passo que duas *configurações* podem ser interconvertidas somente com a quebra de uma ligação covalente. Para interconverter as configurações α e β , a ligação envolvendo o átomo de oxigênio do anel precisa ser rompida, mas a interconversão de duas formas em cadeira (que são *conformêmeros*) não requer quebra de ligações e não altera as configurações de nenhum dos carbonos do anel. As estruturas tridimensionais específicas de unidades de monossacarídeos são importantes para a determinação das propriedades biológicas e das funções de alguns polissacarídeos, como será visto.

Os organismos contêm diversos derivados de hexoses

Além das hexoses simples, como glicose, galactose e manose, existe uma variedade de derivados de açúcar nos quais o grupo hidroxila do composto parental é substituído por outro grupamento ou um átomo de carbono é oxidado a um

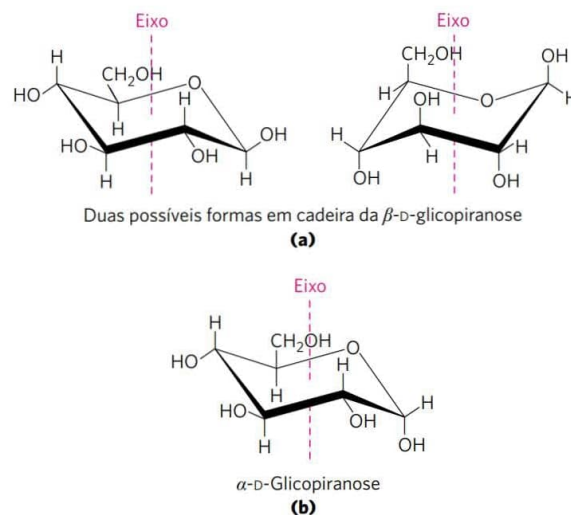


FIGURA 7-8 Fórmulas conformacionais de piranoses. (a) Duas formas em cadeira do anel piranose de β -glicopirranose. Dois *conformêmeros* como estes não são prontamente interconvertíveis; um aporte de cerca de 46 kJ de energia por mol de açúcar é necessário para forçar a interconversão das formas em cadeira. Outra conformação, o “barco” (não mostrada), é vista apenas em derivados com substituintes muito grandes. (b) A conformação em cadeira preferencial da α -D-glicopirranose.

grupo carboxila (**Figura 7-9**). Na glicosamina, na galactosamina e na manosamina, a hidroxila no C-2 do composto parental está substituída por um grupo amina. Normalmente, o grupo amina está condensado ao ácido acético, como na *N*-acetilglicosamina. Esse derivado da glicosamina compõe muitos polímeros estruturais, incluindo aqueles da parede celular de bactérias. A substituição da hidroxila em C-6 na *L*-galactose ou na *L*-manose por um hidrogênio produz *L*-fucose ou *L*-ramnose, respectivamente. A *L*-fucose é encontrada em oligossacarídeos complexos componentes de glicoproteínas e glicolípídeos; a *L*-ramnose é encontrada em polissacarídeos de vegetais.

A oxidação do carbono da carbonila (aldeído) na glicose produz uma carboxila e gera o ácido glicônico, utilizado na medicina como um contra-íon inócuo para a administração de fármacos carregados positivamente

(como o quinino) ou íons (como o Ca^{2+}). Outras aldoses originarão outros **ácidos aldônicos**. A oxidação do carbono na outra extremidade da cadeia carbônica – C-6 da glicose, galactose ou manose – forma o **ácido urônico** correspondente: os ácidos glicurônico, galacturônico ou manurônico. Tanto os ácidos aldônicos como os urônicos formam ésteres intramoleculares estáveis, chamados de lactonas (Figura 7-9, embaixo, à esquerda). Os ácidos siálicos constituem uma família de açúcares com o mesmo esqueleto de nove carbonos. Um deles, o ácido *N*-acetilneuramínico (frequentemente chamado simplesmente de “ácido siálico”), é um derivado da *N*-acetilmanosamina que ocorre em muitas glicoproteínas e glicolípídeos de superfície celular em animais, fornecendo sítios de reconhecimento por outras células ou por proteínas extracelulares que ligam carboidratos. Os grupos ácidos carboxílicos

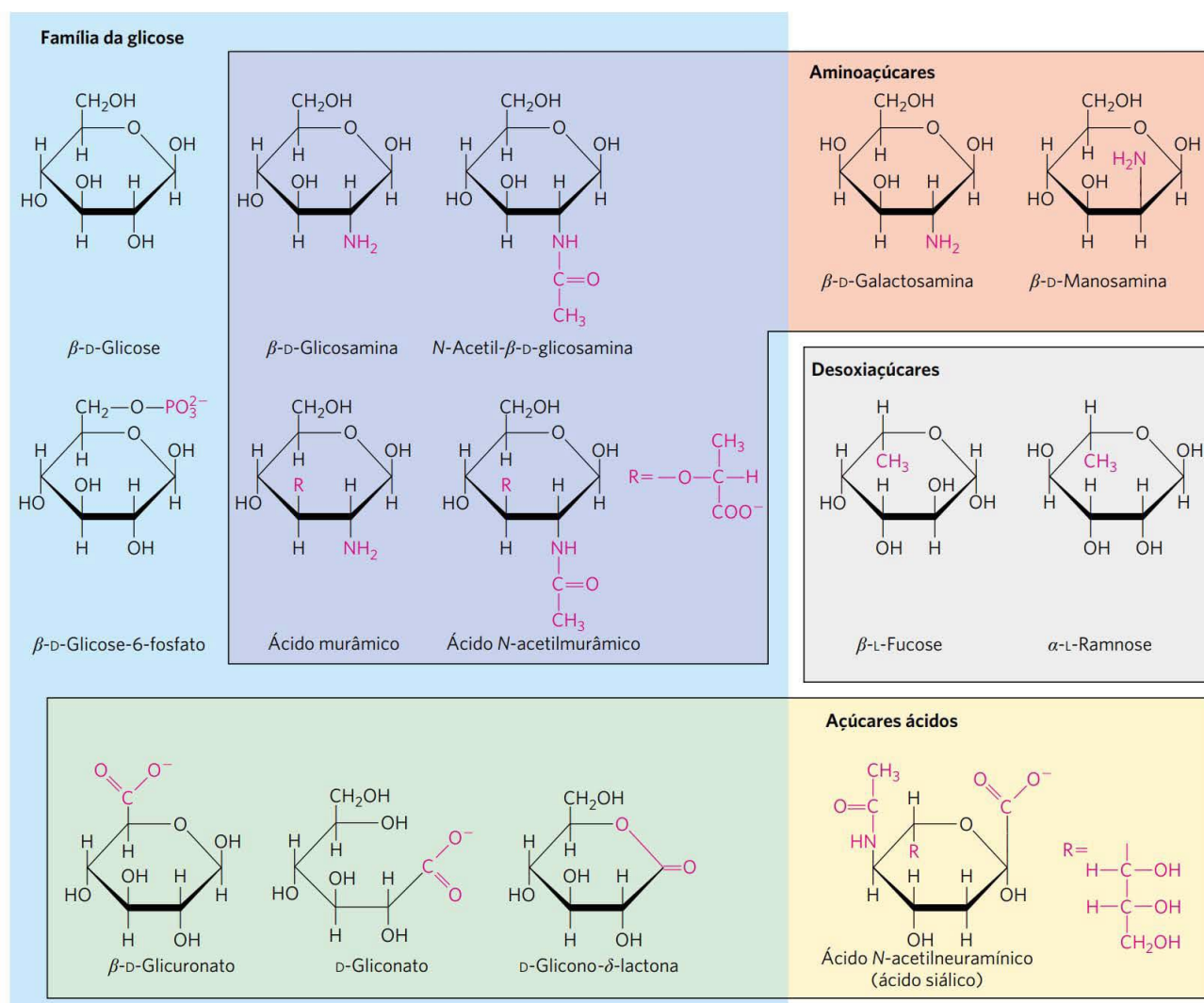


FIGURA 7-9 Alguns derivados de hexoses importantes na biologia. Nos aminoaçúcares, um grupo $-\text{NH}_2$ substitui um dos grupos $-\text{OH}$ na hexose parental. A substituição de uma hidroxila por um átomo de H origina um desoxiaçúcar; observe que os desoxiaçúcares mostrados aqui ocorrem como isômeros *L* na natureza. Os açúcares ácidos contêm um grupo carboxilato, o que confere carga negativa em pH neutro. A *D*-glicono- δ -lactona é o resultado da formação de uma ligação éster entre o grupo carboxilato em C-1 e o grupo hidroxila em C-5 (também conhecido como o carbono δ do gliconato).

dos derivados de açúcares ácidos estão ionizados em pH 7, e esses compostos são, portanto, corretamente nomeados como carboxilatos – glicuronato, galacturonato, e assim por diante.

Muito frequentemente durante a síntese e o metabolismo de carboidratos, os intermediários não são os próprios açúcares, mas os seus derivados fosforilados. A condensação do ácido fosfórico com um dos grupos hidroxila de um açúcar forma um éster de fosfato, como na glicose-6-fosfato

(Figura 7-9), o primeiro metabólito da rota por meio da qual a maioria dos organismos oxida a glicose para produzir energia. Os açúcares fosforilados são relativamente estáveis em pH neutro e têm carga negativa. Um dos efeitos da fosforilação intracelular de açúcares é o confinamento do açúcar dentro da célula; a maioria das células não tem transportadores para açúcares fosforilados na membrana plasmática. A fosforilação também ativa açúcares para subsequente transformação química. Alguns importantes derivados de

QUADRO 7-1



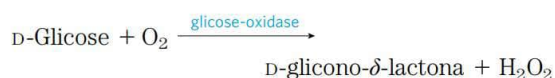
MEDICINA

Medidas da glicose sanguínea no diagnóstico e no tratamento do diabetes

A glicose é o principal combustível para o encéfalo. Quando a quantidade de glicose que chega até o encéfalo é muito baixa, as consequências podem ser desastrosas: letargia, coma, dano cerebral permanente e morte (ver Figura 23-25). Com a evolução, os animais desenvolveram mecanismos hormonais complexos para garantir que a concentração de glicose no sangue permaneça alta o suficiente (aproximadamente 5 mM) para satisfazer as necessidades do encéfalo, mas não alta demais, já que níveis elevados de glicose no sangue também podem ter consequências fisiológicas sérias.

Indivíduos com diabetes melito dependente de insulina não produzem quantidade suficiente de insulina, que, normalmente, atua no sentido de reduzir a concentração de glicose no sangue. Se o diabetes não for tratado, as concentrações de glicose no sangue podem aumentar em diversas vezes acima do nível normal. Acredita-se que esses altos níveis de glicose sejam pelo menos uma das causas das sérias consequências de longo prazo no diabetes não tratado – insuficiência renal, doenças cardiovasculares, cegueira e cicatrização prejudicada –, de modo que um dos objetivos da terapia é prover exatamente a quantidade de insulina suficiente (por injeção) para manter os níveis de glicose próximos do normal. Para manter o balanço correto entre exercício, dieta e insulina para cada indivíduo, a concentração de glicose sanguínea deve ser medida algumas vezes ao dia, e a quantidade de insulina injetada deve ser ajustada de modo apropriado.

As concentrações de glicose no sangue e na urina podem ser determinadas por meio de um ensaio simples para açúcares redutores, como a reação de Fehling, que, por muitos anos, foi o teste diagnóstico padrão para diabetes. Métodos modernos de medida da glicose precisam de apenas uma gota de sangue, que é colocada sobre uma fita de teste contendo a enzima glicose-oxidase, que catalisa a seguinte reação:



Uma segunda enzima, uma peroxidase, catalisa a reação entre o H_2O_2 e um composto incolor, gerando um produto colorido, quantificado com um fotômetro simples que mostra a concentração de glicose no sangue.

Como os níveis de glicose sanguínea variam com os períodos de refeição e exercício, essas medidas em momen-

tos específicos não refletem a glicose sanguínea *média* ao longo de horas ou dias, de modo que elevações perigosas podem passar despercebidas. A concentração média de glicose pode ser estimada pelo seu efeito na hemoglobina, a proteína carreadora de oxigênio dos eritrócitos (p. 163). Transportadores na membrana dos eritrócitos equilibram a concentração de glicose intracelular e plasmática, de modo que a hemoglobina está constantemente exposta à concentração de glicose presente no sangue, qualquer que seja essa concentração. Uma reação não enzimática ocorre entre a glicose e os grupos amina primários da hemoglobina (tanto a Val aminoterminal quanto os grupos amino dos resíduos de Lys; Figura Q-1). A velocidade desse processo é proporcional à concentração de glicose; por isso, essa reação pode ser usada como base para a estimativa do nível médio de glicose sanguínea ao longo de semanas. A quantidade de hemoglobina glicada (HbG) circulante em qualquer momento reflete a concentração de glicose sanguínea média durante o “período de vida” do eritrócito (cerca de 120 dias), embora a concentração das últimas duas semanas anteriores ao teste seja a mais importante na determinação do nível de HbG.

A extensão de **glicação da hemoglobina** (chamada assim para distingui-la da glicosilação, a transferência *enzimática* de glicose a uma proteína) é medida clinicamente pela extração da hemoglobina de uma pequena amostra de sangue seguida pela separação eletroforética de HbG e hemoglobina não modificada (Figura Q-2), aproveitando a diferença de carga resultante da modificação do(s) grupo(s) amina. Valores normais de hemoglobina monoglicada, denominada HbA1c, representam cerca de 5% do total da hemoglobina (correspondendo a uma concentração de glicose no sangue de 120 mg/100 mL). Em pessoas com diabetes não tratado, entretanto, esse valor pode ser tão alto quanto 13%, indicando um nível de glicose sanguínea médio de cerca de 300 mg/100 mL, ou seja, perigosamente alto. Um dos critérios para o sucesso em um programa individual de terapia com insulina (momento da administração, frequência e quantidade de insulina injetada) é a manutenção dos valores de HbA1c em cerca de 7%.

Na reação de glicação da hemoglobina, a primeira etapa (formação de uma base de Schiff) é seguida por uma série de rearranjos, oxidações e desidratações da porção de carboidrato, produzindo uma mistura heterogênea de AGE (produtos finais de glicação avançada; do inglês, *advanced glycation end products*). Esses produtos podem

açúcares fosforilados são componentes dos nucleotídeos (discutidos no próximo capítulo).

Os monossacarídeos são agentes redutores



Os monossacarídeos podem ser oxidados por agentes oxidantes relativamente suaves, como o íon cúprico (Cu^{2+}). O carbono da carbonila é oxidado a um grupo carboxila. A glicose e outros açúcares capazes de reduzir o

íon cúprico são chamados de **açúcares redutores**; os açúcares são oxidados, resultando em uma mistura complexa de ácidos carboxílicos. Essa é a base da reação de Fehling, teste semiquantitativo para a presença de açúcares redutores que, por muitos anos, foi utilizado para detectar e medir níveis elevados de glicose em pessoas com diabetes melito. Hoje, utilizam-se métodos mais sensíveis, que envolvem uma enzima imobilizada em uma tira de teste e requerem apenas uma única gota de sangue. ■

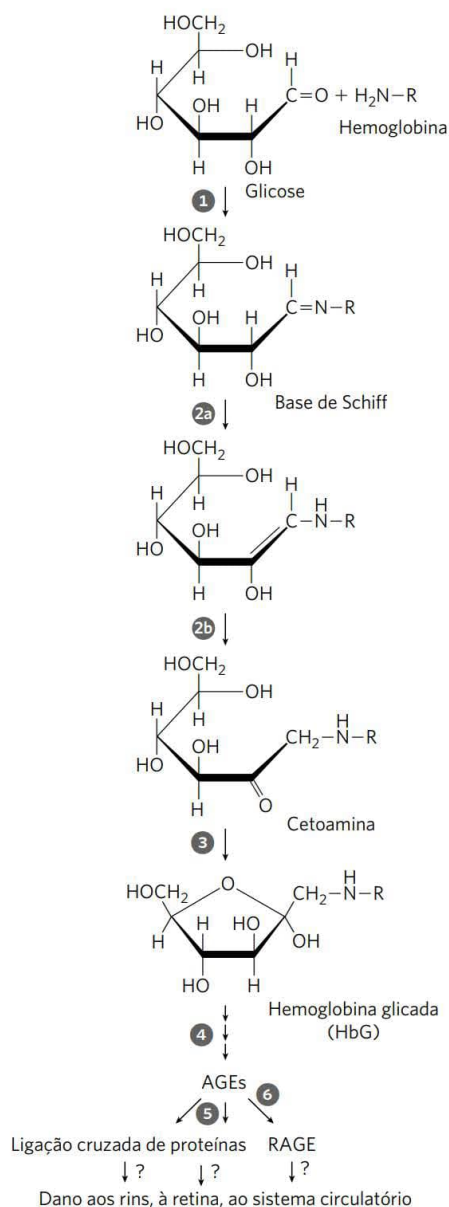


FIGURA Q-1 A reação não enzimática da glicose com um grupo amina primário na hemoglobina começa com 1 a formação de uma base de Schiff, a qual 2 sofre um rearranjo para gerar um produto estável; 3 esta cetamina depois se converte em sua forma cíclica, originando HbG. 4 As reações seguintes geram produtos finais de glicação avançada (AGEs), como a ϵ -N-carboximetil-lisina e metilgloxal, compostos que 5 danificam outras proteínas ao ligá-las de modo cruzado, causando alterações patológicas. 6 O receptor para AGEs (RAGE), ativado por AGEs, estimula eventos a jusante, incluindo inflamação.

deixar o eritrócito e formar ligações cruzadas covalentes entre as proteínas, interferindo com a função normal delas (Figura Q-1). O acúmulo de concentrações relativamente altas de AGEs em pessoas com diabetes pode causar, pela ligação cruzada de proteínas críticas, os problemas aos rins, à retina e ao sistema circulatório que caracterizam a doença. Esse processo patogênico é um potencial alvo para a ação de fármacos. Os AGEs também atuam por meio de receptores transmembrana para AGEs, ou RAGEs, que disparam a resposta inflamatória associada ao diabetes.

Identificação do analito	Porcentagem	Tempo (min)	Área
Injeção	0,0	0,11	17.682
A1a	0,4	0,30	8.051
A1b	1,0	0,45	19.267
A1c	5,9	1,10	110.946
A0	92,6	1,56	1.727.669
Área total 1.883.615			

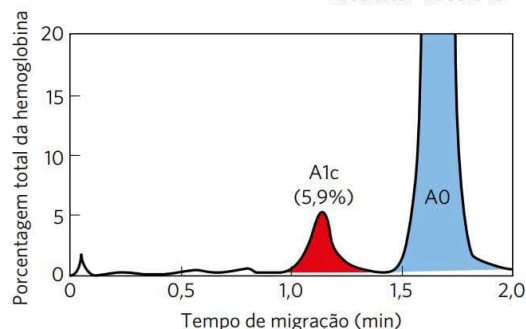


FIGURA Q-2 Padrão de hemoglobina (detectada por sua absorção em 415 nm) após separação eletroforética das formas monoglicada (A1c) e não glicada (A0) em um fino capilar de vidro. A integração da área sob os picos permite o cálculo da quantidade de HbG (HbA1c) como porcentagem total da hemoglobina. Aqui é mostrado o perfil de um indivíduo com nível normal de HbA1c (5,9%).

Os dissacarídeos contêm uma ligação glicosídica

Os dissacarídeos (como maltose, lactose e sacarose) consistem em dois monossacarídeos unidos covalentemente por uma **ligação O-glicosídica**, a qual é formada quando um grupo hidroxila de uma molécula de açúcar, normalmente cíclica, reage com o carbono anomérico de outra molécula (**Figura 7-10**). Essa reação representa a formação de um acetal a partir de um hemiacetal (como a glicopirranose) e um álcool (um grupo hidroxila da segunda molécula de açúcar) (**Figura 7-5**), e o composto resultante é chamado de glicosídeo. Ligações glicosídicas são prontamente hidrolisadas por ácido, mas resistem à clivagem por base. Assim, os dissacarídeos podem ser hidrolisados para originar seus componentes monossacarídicos livres por fervura em ácido diluído. **Ligações N-glicosídicas** unem o carbono anomérico de um açúcar a um átomo de nitrogênio em glicoproteínas (ver **Figura 7-30**) e nucleotídeos (ver **Figura 8-1**).

A oxidação de um açúcar pelo íon cúprico (a reação que define um açúcar redutor) ocorre apenas com a forma linear, a qual existe em equilíbrio com a(s) forma(s) cíclica(s). Quando o carbono anomérico está envolvido em uma ligação glicosídica (i.e., quando o composto for um acetal ou cetal completo; ver **Figura 7-5**), a fácil interconversão entre as formas lineares e cíclicas mostrada na **Figura 7-6** é impedida. Como o carbono da carbonila pode ser oxidado somente quando o açúcar estiver em sua forma linear, a formação de uma ligação glicosídica gera um açúcar não redutor. Na descrição de dissacarídeos ou polissacarídeos,

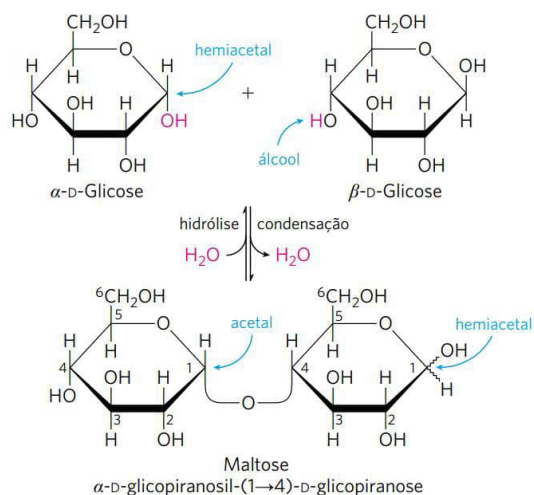


FIGURA 7-10 Formação da maltose. Um dissacarídeo é formado a partir de dois monossacarídeos (aqui, duas moléculas de D-glicose) quando um grupo —OH (álcool) de uma molécula de monossacarídeo (à direita) se condensa com o hemiacetal intramolecular da outra molécula (à esquerda), com a eliminação de H_2O e a formação de uma ligação glicosídica. O inverso dessa reação é uma hidrólise — o ataque da ligação glicosídica pela água. A molécula de maltose, mostrada aqui, conserva um hemiacetal redutor no C-1 não envolvido na ligação glicosídica. Como a mutarrotação interconverte as formas α e β do hemiacetal, as ligações nesta posição algumas vezes são representadas por linhas onduladas, conforme mostrado aqui, para indicar que a estrutura pode ser tanto α quanto β .

a extremidade de uma cadeia com um carbono anomérico livre (não envolvido em ligação glicosídica) normalmente é chamada de **extremidade redutora**.

O dissacarídeo maltose (**Figura 7-10**) contém dois resíduos de D-glicose unidos por uma ligação glicosídica entre o C-1 (o carbono anomérico) de um resíduo de glicose e o C-4 do outro. Como o dissacarídeo conserva um carbono anomérico livre (o C-1 do resíduo de glicose à direita na **Figura 7-10**), a maltose é um açúcar redutor. A configuração do átomo de carbono anomérico na ligação glicosídica é α . O resíduo de glicose com o carbono anomérico livre pode existir nas formas α -piranose ou β -piranose.

>> Convenção-chave: para nomear dissacarídeos redutores como a maltose de forma não ambígua e, sobretudo, para nomear oligossacarídeos mais complexos, algumas regras devem ser seguidas. Por convenção, o nome descreve o composto escrito com a extremidade não redutora à esquerda, e é possível “construir” o nome na seguinte ordem: (1) dar a configuração (α ou β) do carbono anomérico que une a primeira unidade de monossacarídeo (à esquerda) com a segunda. (2) Identificar o resíduo não redutor; para distinguir entre estruturas em anel de cinco e seis membros, inserir “furano” ou “pirano” no nome. (3) Indicar entre parênteses os dois átomos de carbono unidos pela ligação glicosídica, usando uma seta para conectar os dois números; por exemplo, (1→4) mostra que o C-1 do resíduo de açúcar nomeado primeiramente está unido ao C-4 do segundo. (4) Designar o segundo resíduo. Se houver um terceiro resíduo, descrever a segunda ligação glicosídica seguindo as mesmas convenções. (Para encurtar a descrição de polissacarídeos complexos, abreviações de três letras ou símbolos coloridos para os monossacarídeos frequentemente são utilizados, como apresentado na **Tabela 7-1**.) Seguindo essa convenção para a nomenclatura de oligossacarídeos, a maltose é α -D-glicopiranosil-(1→4)-D-glicopirranose. Como em

TABELA 7-1 Símbolos e abreviações para monossacarídeos comuns e alguns de seus derivados

Abequose	Abe	Ácido glicurônico	◆ GLcA
Arabinose	Ara	Galactosamina	◻ GalN
Frutose	Fru	Glicosamina	◼ GlcN
Fucose	▲ Fuc	N-Acetilgalactosamina	◻ GalNAc
Galactose	◉ Gal	N-Acetilglicosamina	◼ GlcNAc
Glicose	● Glc	Ácido idurônico	◊ IdoA
Manose	● Man	Ácido murâmico	Mur
Ramnose	Ram	Ácido N-acetilmurâmico	Mur2Ac
Ribose	Rib	Ácido N-acetilneuramínico (um ácido siálico)	◆ Neu5Ac
Xilose	★ Xil		

Nota: em uma convenção comumente utilizada, as hexoses são representadas como círculos, N-acetil-hexosaminas são quadrados e hexosaminas são quadrados divididos na diagonal. Todos os açúcares com a configuração “glico” são azuis, aqueles com a configuração “galacto” são amarelos e os açúcares “mano” são verdes. Outros substituintes podem ser adicionados conforme a necessidade: sulfato (S), fosfato (P), O-acetil (OAc) ou O-metil (OMe).

sua maioria os açúcares encontrados neste livro são os enantiômeros D e a forma piranose das hexoses é predominante, geralmente se utiliza uma versão abreviada do nome formal desses compostos, dando a configuração do carbono anomérico e nomeando os carbonos unidos pela ligação glicosídica. Nesta nomenclatura abreviada, a maltose é $\text{Glc}(\alpha 1 \rightarrow 4)\text{Glc}$. ◀◀

O dissacarídeo lactose (**Figura 7-11**), que produz D-galactose e D-glicose quando hidrolisado, ocorre naturalmente no leite. O carbono anomérico do resíduo de glicose está disponível para oxidação e, portanto, a lactose é um dissacarídeo redutor. Seu nome abreviado é $\text{Gal}(\beta 1 \rightarrow 4)\text{Glc}$. A enzima lactase – ausente em indivíduos com intolerância a esse dissacarídeo – inicia o processo digestivo no intestino delgado pela hidrólise da ligação $\beta 1 \rightarrow 4$ da lactose, resultando em monossacarídeos que podem ser absorvidos a partir do intestino delgado. A lactose, como outros dissacarídeos, não é absorvida a partir do intestino delgado, e, em indivíduos intolerantes à lactose, a lactose não digerida passa para o intestino grosso. Ali, o aumento na osmolaridade devido à lactose dissolvida se contrapõe à absorção de água a partir do intestino para a corrente sanguínea, levando a fezes diarreicas. Além disso, a fermentação da lactose

por bactérias intestinais produz grandes volumes de CO_2 , levando a inchaço, cólicas e gases, sintomas associados à intolerância à lactose.

A sacarose (açúcar de mesa) é um dissacarídeo de glicose e frutose, sintetizada por plantas, mas não por animais. Ao contrário da maltose e da lactose, a sacarose não contém um átomo de carbono anomérico livre; os carbonos anoméricos de ambas as unidades monossacarídicas estão envolvidos na ligação glicosídica (Figura 7-11). A sacarose é, assim, um açúcar não redutor, e sua estabilidade frente à oxidação a torna uma molécula adequada para o armazenamento e o transporte de energia em plantas. Na nomenclatura abreviada, uma seta com duas pontas conecta os símbolos que especificam os carbonos anoméricos e suas configurações. Assim, o nome abreviado da sacarose é ou $\text{Glc}(\alpha 1 \leftrightarrow \beta 2)\text{Fru}$ ou $\text{Fru}(\beta 2 \leftrightarrow \alpha 1)\text{Glc}$. A sacarose é o principal produto intermediário da fotossíntese; em muitas plantas, ela é a principal maneira de transportar o açúcar das folhas para as outras partes do corpo da planta.

A trealose, $\text{Glc}(\alpha 1 \leftrightarrow \alpha 1)\text{Glc}$ (Figura 7-11) – dissacarídeo de D-glicose que, como a sacarose, é um açúcar não redutor –, é um constituinte importante do fluido circulante (hemolinfa) de insetos, servindo como composto de armazenamento de energia.

A lactose dá ao leite o seu sabor adocicado, e a sacarose, como se sabe, é o açúcar de mesa. A trealose também é comercialmente utilizada como adoçante. O Quadro 7-2 explica a percepção do sabor doce pelos seres humanos e o modo de ação dos adoçantes artificiais, como o aspartame.

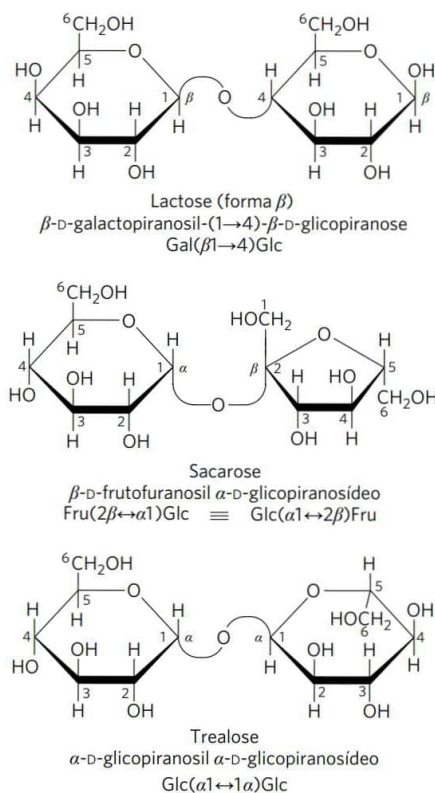


FIGURA 7-11 Dois dissacarídeos comuns. Como a maltose da Figura 7-10, estes dissacarídeos estão representados como perspectivas de Haworth. O nome comum, o nome sistemático completo e a abreviação estão mostrados para cada dissacarídeo. A nomenclatura formal da sacarose nomeia a glicose como o glicosídeo parental, embora a sacarose seja normalmente representada como mostrado, com a glicose à esquerda. Os dois símbolos abreviados mostrados para a sacarose são equivalentes (\equiv).

RESUMO 7.1 Monossacarídeos e dissacarídeos

- Os açúcares (também chamados de sacarídeos) são compostos que contêm um grupo aldeído ou cetona e dois ou mais grupos hidroxila.
- Os monossacarídeos geralmente contêm carbonos quirais e, assim, existem em várias formas estereoquímicas, as quais podem ser representadas no papel como projeções de Fischer. Epímeros são açúcares que diferem na configuração de apenas um átomo de carbono.
- Os monossacarídeos comumente formam hemiacetais ou hemicetais internos, nos quais o grupo aldeído ou cetona se une a um grupo hidroxila da mesma molécula, criando uma estrutura cíclica; isso pode ser representado como uma fórmula em perspectiva de Haworth. O átomo de carbono originalmente localizado no grupo aldeído ou cetona (o carbono anomérico) pode assumir uma de duas configurações, α e β , interconvertíveis por mutarotação. Na forma linear do monossacarídeo, em equilíbrio com as formas cíclicas, o carbono anomérico é facilmente oxidável, tornando o composto um açúcar redutor.
- Um grupo hidroxila de um monossacarídeo pode ser adicionado ao carbono anomérico de um segundo monossacarídeo, formando um acetal, chamado de glicosídeo. Nesse dissacarídeo, a ligação glicosídica protege o carbono anomérico da oxidação, tornando-o um açúcar não redutor.

QUADRO 7-2 O açúcar é doce, assim como... algumas outras coisas

O doce é um dos cinco sabores básicos que os seres humanos podem sentir (Figura Q-1); os outros são azedo, amargo, salgado e umami. O sabor doce é detectado por receptores proteicos presentes na membrana plasmática das células gustativas nas papilas gustativas da superfície da língua. Em seres humanos, dois genes bastante relacionados (*T1R2* e *T1R3*) codificam os receptores para o sabor doce (Figura Q-2). Quando uma molécula com uma estrutura compatível se liga a esses receptores no domínio extracelular de um receptor gustativo, ela desencadeia uma série de eventos dentro da célula (incluindo a ativação de uma proteína ligadora de GTP; ver Figura 12-16) que levam à emissão de um sinal elétrico para o encéfalo, o qual é, então, interpretado como “doce”. Durante a evolução, houve, provavelmente, a seleção para a capacidade de saborear



FIGURA Q-1 Um formidável estímulo para os receptores do sabor doce. Fonte: David Cook/blueshiftstudios/Alamy.]

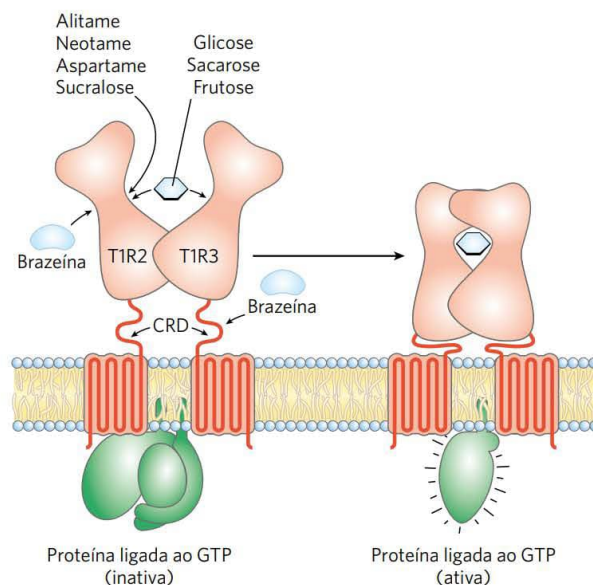


FIGURA Q-2 O receptor para substâncias com sabor doce, com indicação de suas regiões de interação (setas curtas) com vários compostos com sabor doce. Cada receptor tem um domínio extracelular, um domínio rico em cisteína (CRD), e um domínio de membrana com sete hélices transmembrana, característica comum em receptores de sinalização. Os adoçantes artificiais ligam-se a apenas uma das duas subunidades do receptor; os açúcares naturais ligam-se às duas. Consulte, no Capítulo 1, Problema 16, as estruturas de muitos desses adoçantes artificiais. T1R2 e T1R3 são as proteínas codificadas pelos genes *T1R2* e *T1R3*. [Fonte: informação obtida de F. M. Assadi-Porter et al., *J. Mol. Biol.* 398:584, 2010, Fig. 1.]

- Oligossacarídeos são polímeros curtos de diversos monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas. Em uma das extremidades da cadeia, a extremidade redutora, está uma unidade de monossacarídeo com seu carbono anomérico não envolvido em uma ligação glicosídica.
- A nomenclatura comum para di ou oligossacarídeos especifica a ordem das unidades de monossacarídeos, a configuração de cada carbono anomérico e os átomos de carbono participantes da(s) ligação(ões) glicosídica(s).

7.2 Polissacarídeos

A maioria dos carboidratos ocorre na natureza como polissacarídeos, polímeros de média a alta massa molecular ($M_r > 20.000$). Os polissacarídeos, também chamados de **glicanos**, diferem uns dos outros na identidade das unidades de monossacarídeos repetidas, no comprimento das cadeias, nos tipos de ligações unindo as unidades e no grau de ramificação. Os **homopolissacarídeos** contêm somente uma única espécie monomérica; os **heteropolissacarídeos** contêm dois ou mais tipos diferentes (Figura 7-12). Alguns homopolissacarídeos, como o amido e o glicogênio, servem como formas de armazenamento para monossacari-

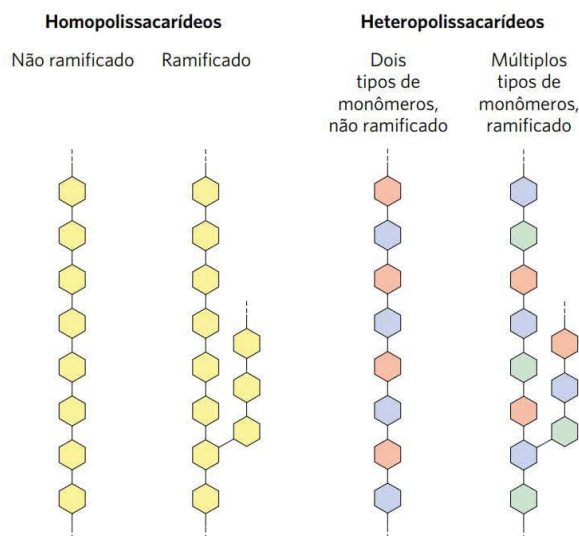


FIGURA 7-12 Homopolissacarídeos e heteropolissacarídeos. Os polissacarídeos podem ser compostos por um, dois ou alguns monossacarídeos diferentes, em cadeias lineares ou ramificadas de vários comprimentos.

os compostos presentes nos alimentos contendo nutrientes importantes, como os carboidratos, que são o principal combustível para a maioria dos organismos. A maioria dos açúcares simples, incluindo sacarose, glicose e frutose, tem sabor doce, mas há outras classes de compostos que também são capazes de se ligar a receptores de doce. Os aminoácidos glicina, alanina e serina são levemente doces e não causam danos; nitrobenzeno e etilenoglicol têm forte sabor doce, mas são tóxicos. (Ver Quadro 18-2 para um notável mistério médico envolvendo o envenenamento por etilenoglicol.) Diversos produtos naturais são extraordinariamente doces. Steviosídeo, um derivado de açúcar isolado das folhas da stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni), é centenas de vezes mais doce que uma quantidade equivalente de sacarose (o açúcar de mesa). A pequena proteína brazeína (54 aminoácidos), isolada dos frutos do arbusto Oubli (*Pentadiplandra brazzeana* Baillon), que ocorre no Gabão e nos Camarões, é 17.000 vezes mais doce que a sacarose em uma comparação molar. Presume-se que o sabor doce desses frutos estimule seu consumo pelos animais, que, então, dispersam as sementes, de modo que novas plantas podem se estabelecer.

Existe um grande interesse no desenvolvimento de adoçantes artificiais (compostos que forneçam aos alimentos sabor doce sem adicionar as calorias encontradas nos açúcares) para auxiliar na redução do peso. O adoçante artificial aspartame demonstra a importância da estereoquímica na biologia (Figura Q-3). De acordo com um modelo simples para a ligação ao receptor do sabor doce, a ligação envolve três sítios do receptor: AH^+ , B^- e X. O sítio AH^+ contém um grupo (um álcool ou amina) que pode estabelecer uma ligação de hidrogênio com um

grupo com carga parcialmente negativa, como o oxigênio de uma carbonila, na molécula do adoçante; o grupo carboxila do aspartame contém um oxigênio assim. O sítio B^- contém um grupo com um oxigênio parcialmente negativo disponível para formar uma ligação de hidrogênio com algum átomo parcialmente positivo da molécula do adoçante, como o grupo amina do aspartame. O sítio X é orientado perpendicularmente aos outros dois grupos e é capaz de interagir com uma região hidrofóbica da molécula do adoçante, como o anel benzênico do aspartame.

Quando o pareamento espacial estiver correto, como na Figura Q-3, à esquerda, o receptor do sabor doce será estimulado e o sinal “doce” será conduzido ao encéfalo. Quando o pareamento não estiver correto, como na Figura Q-3, à direita, o receptor do sabor doce não será estimulado; na verdade, neste caso, outro receptor (para o sabor amargo) será estimulado pelo estereoisômero “errado” do aspartame. Estereoisomerismo realmente importa!

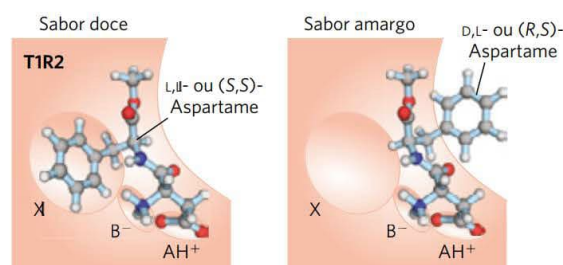


FIGURA Q-3 A base estereoquímica para o sabor dos dois isômeros do aspartame. (Fonte: informação obtida de <http://chemistry.elmhurst.edu/vchembook/549receptor.html>, © Charles E. Ophardt, Elmhurst College.)

deos utilizados como combustíveis. Outros homopolissacarídeos, como a celulose e a quitina, atuam como elementos estruturais em paredes celulares de plantas e em exoesqueletos de animais. Os heteropolissacarídeos fornecem suporte extracelular para organismos de todos os reinos. Por exemplo, a camada rígida do envelope celular bacteriano (o peptidoglicano) é parcialmente composta por um heteropolissacarídeo construído por duas unidades alternadas de monossacarídeo (ver Figura 6-28). Nos tecidos animais, o espaço extracelular é preenchido por alguns tipos de heteropolissacarídeos, os quais formam uma matriz que conecta células individuais e fornece proteção, forma e suporte para células, tecidos e órgãos.

Ao contrário das proteínas, os polissacarídeos geralmente não têm massas moleculares definidas. Essa diferença é uma consequência dos mecanismos de construção dos dois tipos de polímero. Como será visto no Capítulo 27, as proteínas são sintetizadas a partir de um molde (o RNA mensageiro), com sequência e comprimento definidos por enzimas que seguem exatamente esse molde. Para a síntese de polissacarídeos, não existe molde; em vez disso, o programa de síntese de polissacarídeos é intrínseco às enzimas que catalisam a polimerização das unidades monoméricas, e não

há um ponto de parada específico no processo sintético; os produtos, portanto, variam em comprimento.

Alguns homopolissacarídeos são formas de armazenamento de combustível

Os polissacarídeos de armazenamento mais importantes são o amido, em células vegetais, e o glicogênio, em células animais. Ambos são de ocorrência intracelular e formam grandes agrupamentos ou grânulos. As moléculas de amido e glicogênio são extremamente hidratadas, pois têm muitos grupos hidroxila expostos e disponíveis para formarem ligações de hidrogênio com a água. A maioria das células vegetais possui a capacidade de sintetizar amido (ver Figura 20-5), e o seu armazenamento é especialmente abundante em tubérculos – como a batata – e em sementes.

O **amido** contém dois tipos de polímero de glicose, amilose e amilopectina (**Figura 7-13**). A amilose consiste em cadeias longas, não ramificadas, de resíduos de D-glicose conectados por ligações ($\alpha 1 \rightarrow 4$) (como na maltose). A massa molecular dessas cadeias varia entre alguns milhares até mais de um milhão. A amilopectina também tem massa molecular elevada (até 200 milhões), mas, ao contrário da amilose, é altamente ramificada. As ligações

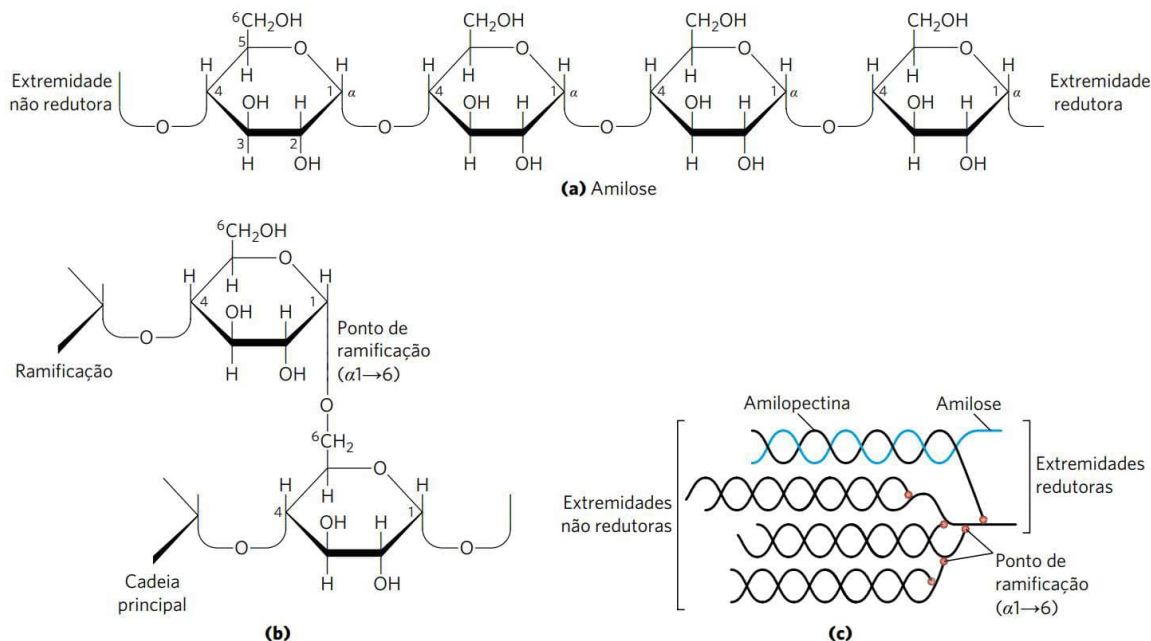


FIGURA 7-13 Glicogênio e amido. (a) Segmento curto de amilose, polímero linear de resíduos de D-glicose em ligações $\alpha(1\rightarrow4)$. Uma única cadeia pode conter alguns milhares de resíduos de glicose. A amilopectina tem trechos de resíduos ligados de maneira similar, situados entre pontos de ramificação. O glicogênio tem a mesma estrutura básica, porém é mais ramificado do que a amilopectina. (b) Ponto de ramificação $\alpha(1\rightarrow6)$ no glicogênio ou na amilopectina. (c) Agrupamento de amilose e amilopectina como o que supostamente ocorre nos grânulos de amido. Fitas de amilopectina (em preto) formam estruturas em dupla-hélice umas com as outras ou com fitas de amilose (em azul). A amilopectina tem pontos de ramificação $\alpha(1\rightarrow6)$ frequentes (em vermelho). Os resíduos de glicose nas extremidades não redutoras das ramificações mais externas são removidos enzimaticamente durante a mobilização do amido para produção de energia. O glicogênio tem estrutura similar, porém é mais ramificado e mais compacto.

glicosídicas que unem os sucessivos resíduos de glicose nas cadeias de amilopectina são $\alpha(1\rightarrow4)$; nos pontos de ramificação (que ocorrem a cada 24 a 30 resíduos) são ligações $\alpha(1\rightarrow6)$.

O **glicogênio** é o principal polissacarídeo de armazenamento das células animais. Como a amilopectina, o glicogênio é um polímero de resíduos de glicose ligados por ligações $\alpha(1\rightarrow4)$, com ligações $\alpha(1\rightarrow6)$ nas ramificações; o glicogênio, porém, é mais ramificado (em média a cada 8 a 12 resíduos) e mais compacto do que o amido. O glicogênio é especialmente abundante no fígado, onde pode constituir até 7% do peso líquido; ele também está presente no músculo esquelético. Nos hepatócitos, o glicogênio é encontrado em grandes grânulos (ver Figura 15-26), os quais são agrupamentos de grânulos menores, compostos por moléculas únicas de glicogênio, altamente ramificadas, com massa molecular média de alguns milhões. Esses grânulos de glicogênio também apresentam firmemente ligadas as enzimas responsáveis pela síntese e degradação do glicogênio (ver Figura 15-42).

Como cada ramificação do glicogênio termina com uma unidade de açúcar não redutora, uma molécula de glicogênio com n ramificações tem $n + 1$ extremidades não redutoras, mas apenas uma extremidade redutora. Quando o glicogênio é utilizado como fonte de energia, as unidades de glicose são removidas uma de cada vez a partir das extremidades não redutoras. As enzimas de degradação, que atuam somente em extremidades não redutoras, podem trabalhar simultaneamente nas muitas ramificações, acelerando a conversão do polímero em monossacarídeos.

Por que não armazenar a glicose em sua forma monomérica? Calcula-se que os hepatócitos armazenam glicogênio equivalente a uma concentração de glicose de 0,4 M. A concentração real de glicogênio, que é insolúvel e pouco contribui para a osmolaridade do citosol, é de cerca de 0,01 μM . Se o citosol contivesse 0,4 M de glicose, a osmolaridade seria significativamente alta, levando à entrada osmótica de água, o que poderia causar a ruptura da célula (ver Figura 2-13). Além disso, com uma concentração de glicose interna igual a 0,4 M e a concentração externa igual a 5 mM (a concentração no sangue de um mamífero), a variação de energia livre para o transporte de glicose para dentro das células contra este gradiente de concentração tão alto seria proibitivamente grande.

As **dextranas** são polissacarídeos de bactérias e leveduras, compostos por resíduos de D-glicose em ligações $\alpha(1\rightarrow6)$; todas as dextranas têm ramificações $\alpha(1\rightarrow3)$, e algumas também têm ramificações $\alpha(1\rightarrow2)$ ou $\alpha(1\rightarrow4)$. A placa dentária, formada por bactérias que crescem na superfície dos dentes, é rica em dextranas, as moléculas adesivas que permitem às bactérias se grudarem nos dentes e umas às outras. As dextranas também fornecem uma fonte de glicose para o metabolismo bacteriano. Dextranas sintéticas são utilizadas em alguns produtos comerciais (p. ex., Sephadex) que servem para o fracionamento de proteínas por meio de cromatografia de peneira molecular, ou exclusão pelo tamanho (ver Figura 3-17b). As dextranas nesses produtos são ligadas quimicamente por ligações cruzadas para formarem materiais insolúveis de vários tamanhos.

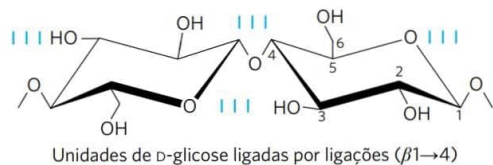


FIGURA 7-14 Celulose. Duas unidades de uma cadeia de celulose; os resíduos de D-glicose estão em ligações ($\beta 1 \rightarrow 4$). As rígidas estruturas em cadeia podem girar uma em relação à outra.

Alguns homopolissacarídeos têm funções estruturais

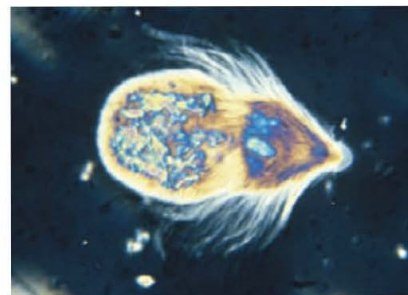
A **celulose** – substância fibrosa, resistente e insolúvel em água – é encontrada na parede celular de plantas, particularmente em caules, troncos e todas as porções amadeiradas do corpo da planta, e constitui grande parte da massa da madeira e quase a totalidade da massa do algodão. Como a amilose, a celulose é um homopolissacarídeo linear e não ramificado, consistindo de 10.000 a 15.000 unidades de D-glicose. Entretanto, existe uma importante diferença: na celulose, os resíduos de D-glicose têm a configuração β (**Figura 7-14**), ao passo que, na amilose, a glicose está em configuração α . Os resíduos de glicose na celulose estão unidos por ligações glicosídicas ($\beta 1 \rightarrow 4$), ao contrário das ligações ($\alpha 1 \rightarrow 4$) da amilose. Devido a essa diferença, as moléculas individuais de celulose e amilose dobram-se espacialmente de maneiras diferentes, dando a essas moléculas estruturas macroscópicas e propriedades físicas muito diferentes (ver a seguir). A natureza rígida e fibrosa da celulose a torna útil para produtos comerciais como papelão e material para isolamento, e ela é um dos principais componentes dos tecidos de algodão e linho. A celulose é também a matéria-prima para a produção comercial de celofane, viscose e tencel.

O glicogênio e o amido ingeridos na dieta são hidrolisados por α -amilases e glicosidases, enzimas encontradas na saliva e no intestino delgado, que quebram as ligações glicosídicas ($\alpha 1 \rightarrow 4$) entre as unidades de glicose. A maioria dos animais vertebrados não consegue utilizar a celulose como uma fonte combustível, pois eles carecem de uma enzima que hidrolise ligações ($\beta 1 \rightarrow 4$). Os cupins digerem a celulose (e, portanto, a madeira) prontamente, mas somente porque carregam no trato intestinal um microrganismo simbiótico, *Trichonympha*, que secreta celulase, enzima que hidrolisa as ligações ($\beta 1 \rightarrow 4$) (**Figura 7-15**). Estudos de genética molecular têm revelado que os genes que codificam as enzimas para a degradação da celulose estão presentes nos genomas de uma ampla gama de animais invertebrados, incluindo artrópodes e nematódeos. Existe uma exceção importante para a ausência da celulase nos vertebrados: os animais ruminantes, como gado, ovelhas e cabras, carregam no rúmen (o primeiro dos quatro compartimentos de seus estômagos) microrganismos simbióticos que conseguem hidrolisar a celulose, permitindo que estes animais degradem a celulose das gramíneas macias de sua dieta, mas não de plantas arbustivas. A fermentação no rúmen gera acetato, propionato e β -hidroxibutirato, que o animal utiliza para sintetizar os açúcares do leite.

A biomassa rica em celulose pode ser utilizada como matéria-prima para a fermentação de carboidratos a etanol, para ser utilizado com um aditivo na gasolina (um biocombustível comum é a gramínea *Panicum virgatum*). A produção anual de biomassa na Terra (realizada principalmente



(a)



(b)

FIGURA 7-15 Degradação da celulase por *Trichonympha*.

(a) O cupim *Cryptotermes domesticus* roe e ingere partículas de madeira, que são ricas em celulose. (b) O *Trichonympha*, um protista simbiótico no intestino do cupim, produz a enzima celulase, que hidrolisa as ligações glicosídicas ($\beta 1 \rightarrow 4$) da celulose, tornando a madeira uma fonte de açúcar metabolizável (glicose) para o protista e para o seu hospedeiro, o cupim. Muitos invertebrados podem digerir a celulose, mas apenas poucos vertebrados (os ruminantes, como os bovinos, ovinos e caprinos) podem fazê-lo, por sua associação a microrganismos. Os ruminantes podem utilizar a celulose como alimento porque o primeiro de seus quatro compartimentos estomacais (o rúmen) está povoado com bactérias e protistas que secretam celulase. Fontes: (a) David McClenaghan/CSIRO Entomology. (b) Eric V. Grave/Science Source.]

pelos organismos fotossintéticos) é o equivalente energético de aproximadamente um trilhão de barris de petróleo, quando convertida a etanol por meio da fermentação. Devido à sua potencial utilidade para a conversão de biomassa em bioenergia, as enzimas que degradam a celulose, como a celulase, estão sob intensa investigação. Complexos supramoleculares chamados de celulosomos, encontrados na superfície externa da bactéria *Clostridium cellulolyticum*, incluem a subunidade catalítica da celulase, juntamente com proteínas que unem uma ou mais moléculas de celulase à superfície bacteriana, e uma subunidade que se liga à celulose e a posiciona no sítio catalítico.

Uma fração importante da biomassa fotossintética está na porção amadeirada das plantas e das árvores, a qual consiste em celulose e outros polímeros derivados de carboidratos não facilmente digeríveis, tanto química como biologicamente. As ligninas, por exemplo, formam aproximadamente 30% da massa da madeira. Sintetizadas a partir de precursores que incluem a fenilalanina e a glicose, as ligninas são polímeros complexos com ligações cruzadas covalentes com a celulose que complicam a digestão da celulose pela celulase. Para que as plantas lenhosas sejam utilizadas para a produção de etanol a partir de biomassa, maneiras melhores para digerir os componentes da madeira precisarão ser encontradas.

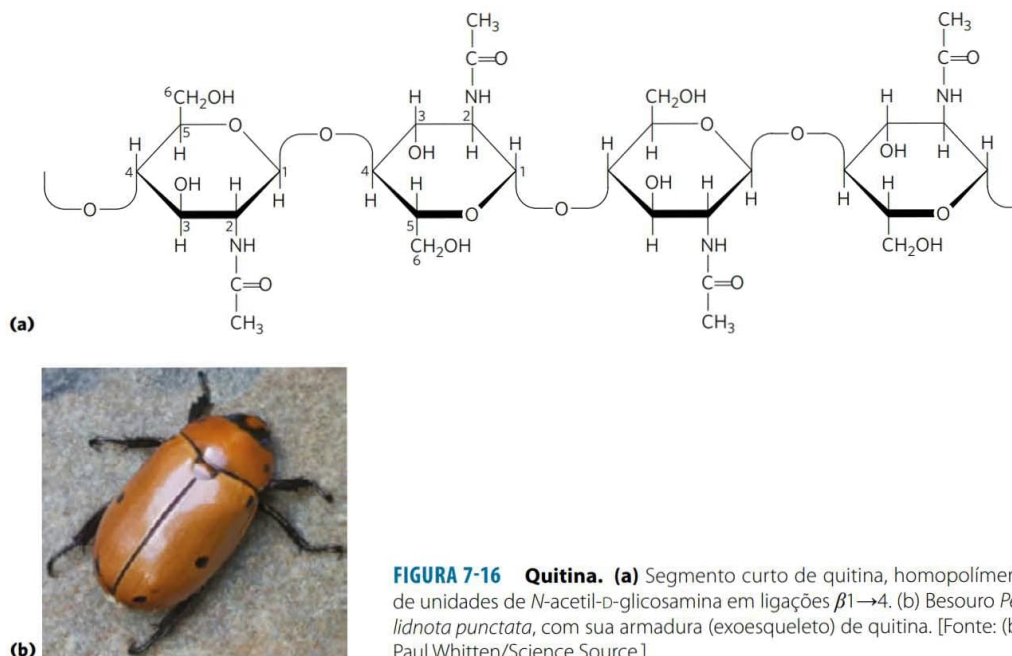


FIGURA 7-16 Quitina. (a) Segmento curto de quitina, homopolímero de unidades de *N*-acetil- β -glicosamina em ligações $\beta 1 \rightarrow 4$. (b) Besouro *Leptodermes punctata*, com sua armadura (exoesqueleto) de quitina. [Fonte: (b) Paul Whitten/Science Source.]

A **quitina** é um homopolissacarídeo linear composto por resíduos de *N*-acetilglicosamina em ligações $\beta 1 \rightarrow 4$ (**Figura 7-16**). A única diferença química deste polissacarídeo em relação à celulose é a substituição de um grupo hidroxila em C-2 por um grupo amina acetilado. A quitina forma fibras longas similares às fibras da celulose e, como a celulose, não pode ser digerida por vertebrados. A quitina é o principal componente dos exoesqueletos duros de aproximadamente 1 milhão de espécies de artrópodos – insetos, lagostas e caranguejos, por exemplo – e é provavelmente o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, depois da celulose; estima-se que 1 bilhão de toneladas de quitina são produzidas a cada ano na biosfera.

Fatores estéricos e ligações de hidrogênio influenciam o enovelamento dos homopolissacarídeos

O enovelamento de polissacarídeos em três dimensões segue os mesmos princípios que governam a estrutura de polipeptídeos: subunidades com estrutura relativamente rígida ditada por ligações covalentes formam estruturas macromoleculares tridimensionais estabilizadas por interações fracas dentro da própria molécula ou intermoleculares, como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, interações de van der Waals e, para polímeros com subunidades carregadas, interações eletrostáticas. Como os polissacarídeos têm muitos grupos hidroxila, as ligações de hidrogênio têm uma influência especialmente importante em suas estruturas. Glicogênio, amido e celulose são compostos por subunidades piranosídicas (anéis de seis membros), assim como os oligossacarídeos de glicoproteínas e glicolipídeos, os quais serão discutidos posteriormente. Essas moléculas podem ser representadas como uma série de rígidos anéis de piranose conectados por um átomo de oxigênio que une dois átomos de carbono (a ligação glicosídica). Existe, em princípio, livre rotação ao redor de ambas as ligações C—O que ligam os resíduos (**Figura 7-14**), porém, como nos polipep-

tídeos (ver Figuras 4-2 e 4-9), a rotação ao redor de cada ligação é limitada pelo impedimento estérico gerado pelos substituintes. As estruturas tridimensionais dessas moléculas podem ser descritas nos termos dos ângulos de diedro, ϕ e ψ , que constituem a ligação glicosídica (**Figura 7-17**), análogos aos ângulos ϕ e ψ formados pela ligação peptídica.

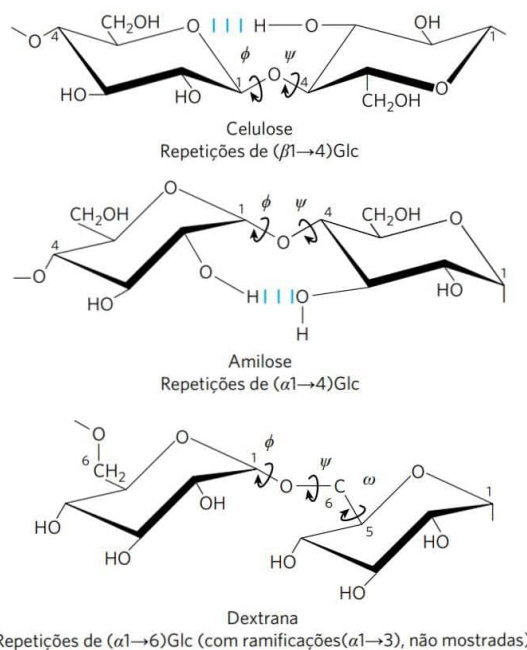


FIGURA 7-17 Conformação das ligações glicosídicas dos polissacarídeos celulose, amilose e dextrana. Os polímeros estão representados como rígidos anéis de piranose unidos por ligações glicosídicas, com livre rotação ao redor dessas ligações. Observe que, na dextrana, também existe livre rotação ao redor da ligação entre C-5 e C-6 (o ângulo de torção ω [ômega]).

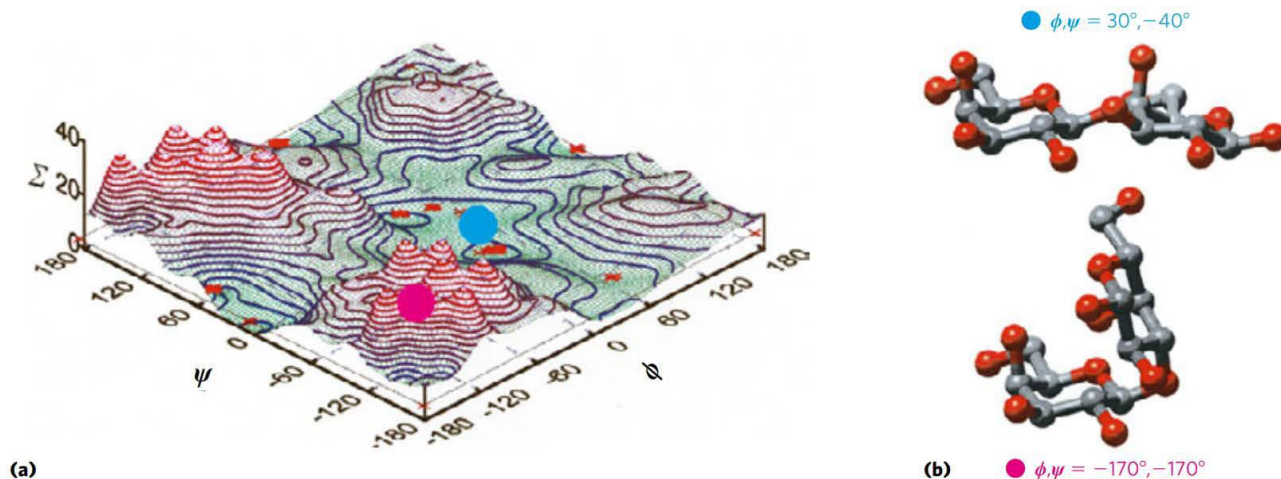


FIGURA 7-18 Mapa das conformações mais comuns em oligossacarídeos e polissacarídeos. Os ângulos de torção ψ (psi) e ϕ (phi) (ver Figura 7-17), que definem as relações espaciais entre anéis adjacentes, podem, em princípio, ter qualquer valor entre 0 e 360°. Na verdade, alguns dos ângulos de torção originariam conformações estericamente impedidas, ao passo que outros originam conformações que maximizam a formação de ligações de hidrogênio. (a) Quando a energia relativa (Σ) para cada valor de ψ e ϕ é representada em um gráfico, com os contornos de isoenergia ("mesma energia") representados em intervalos de 1 kcal/mol acima do estado de energia mínima, o resultado é um mapa das conformações preferenciais. Este mapa é análogo ao gráfico de Ramachandran para peptídeos (ver Figuras 4-3 e 4-9). (b) Dois extremos energéticos para o dissacarídeo Gal($\beta 1 \rightarrow 3$)Gal; estes valores estão representados no diagrama de energia (a) pelos círculos vermelho e azul. O círculo vermelho indica a conformação menos favorecida; o círculo azul indica a conformação mais favorecida. As conformações conhecidas dos três polissacarídeos mostrados na Figura 7-17 foram determinadas por cristalografia por raios X e todas estão dentro das regiões de menor energia do mapa. [Fonte: (a) Cortesia de H.-J. Gabius e Herbert Kaltner, Universidade de Munique, a partir de uma figura fornecida por C.-W. von der Lieth, Heidelberg.]

O volume do anel de piranose e seus substituintes e os efeitos eletrônicos sobre o carbono anomérico constroem os ângulos ϕ e ψ ; assim, certas conformações são muito mais estáveis do que outras, como pode ser mostrado por um mapa da energia em função desses ângulos (Figura 7-18).

A estrutura tridimensional mais estável para as cadeias ligadas por ligações ($\alpha 1 \rightarrow 4$) do amido e do glicogênio é uma hélice firmemente enrolada (Figura 7-19), estabilizada por ligações de hidrogênio entre as cadeias. Na amilose, que não é ramificada, essa estrutura é regular o suficiente para permitir a cristalização e, portanto, a determinação da estrutura por difração de raios X. O plano médio de cada resíduo ao longo da cadeia da amilose forma um ângulo de 60° com o plano médio do resíduo predecessor, de modo que a estrutura em hélice tem seis resíduos por volta. Para a amilose, o centro da hélice tem precisamente as dimensões corretas para acomodar íons complexos de iodo (I_3^- e I_5^-), formando um complexo azul intenso. Essa interação é a base de um teste qualitativo comum para a presença de amilose.

Para a celulose, a conformação mais estável é aquela na qual cada cadeira gira 180° em relação aos vizinhos, o que gera uma cadeia reta e estendida. Todos os grupos —OH estão disponíveis para ligações de hidrogênio com as cadeias vizinhas. Com algumas cadeias estendendo-se lado a lado, uma rede estabilizada por ligações de hidrogênio intercadeia e intracadeia produz fibras supramoleculares retas e estáveis, com grande resistência à tensão (Figura 7-20). Essa propriedade da celulose a torna uma substância útil, e ela tem sido usada pelas civilizações por milênios. Muitos produtos manufaturados, incluindo papel, papelão, viscosa, isolantes e vários outros materiais úteis, são derivados da celulose. O conteúdo de água

desses materiais é baixo, uma vez que o grande número de ligações de hidrogênio entre as cadeias das moléculas de celulose esgota sua capacidade para formação de ligações de hidrogênio.

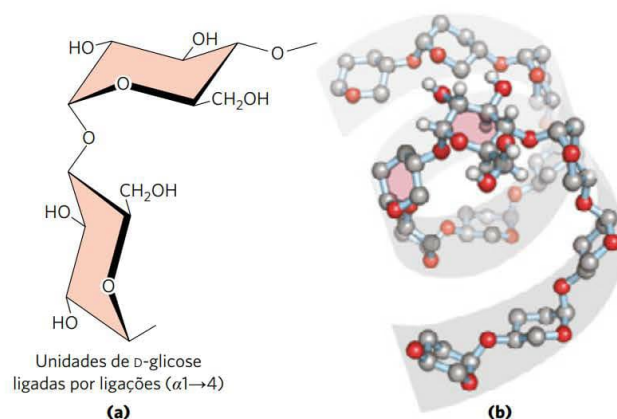


FIGURA 7-19 A estrutura helicoidal do amido (amilose). (a) Na conformação mais estável, devido às rígidas cadeiras adjacentes, a cadeia polissacarídica é curva, em vez de reta como a da celulose (ver Figura 7-14). (b) Modelo de um segmento da amilose; para maior clareza, os grupos hidroxila de apenas um resíduo de glicose estão representados. Compare os dois resíduos sombreados em cor salmão com as estruturas químicas em (a). Pela conformação das ligações ($\alpha 1 \rightarrow 4$) na amilose, na amilopectina e no glicogênio, estes polímeros formam estruturas firmes em hélice enrolada. Estas estruturas compactas originam os densos grânulos de armazenamento de amido ou glicogênio observados em muitas células (ver Figura 20-2). [Fonte: (b) PDB ID 1C58, K. Gessler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:4246, 1999.]

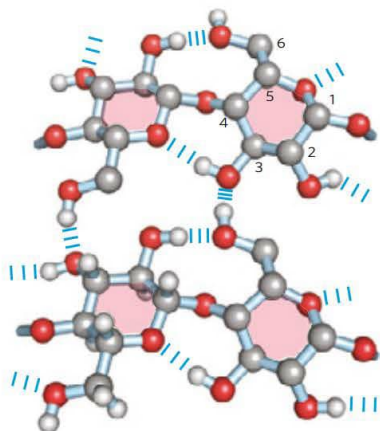


FIGURA 7-20 Cadeias de celulose. Representação em escala de segmentos de duas cadeias de celulose paralelas, mostrando a conformação dos resíduos de D-glicose e as ligações de hidrogênio formando ligações cruzadas. Na unidade de hexose embaixo, à esquerda, estão representados todos os átomos de hidrogênio; nas outras três unidades de hexose, os hidrogênios ligados aos carbonos foram omitidos para maior clareza, já que não participam de ligações de hidrogênio.

As paredes celulares de bactérias e algas contêm heteropolissacarídeos estruturais

O componente rígido das paredes celulares bacterianas (o peptidoglicano) é um heteropolímero de resíduos alternados de *N*-acetilglicosamina e ácido *N*-acetilmurâmico unidos por ligações ($\beta 1 \rightarrow 4$) (ver Figura 20-30). Os polímeros lineares encontram-se lado a lado na parede celular, unidos de modo cruzado por peptídeos curtos, cuja estrutura exata depende da espécie bacteriana. As ligações cruzadas dos peptídeos juntam as cadeias de polissacarídeo em uma bainha resistente (peptidoglicano) que envolve a célula inteira e impede o inchaço e a lise celular devidos à entrada osmótica de água. A enzima lisozima é bactericida porque hidrolisa as ligações glicosídicas ($\beta 1 \rightarrow 4$) entre os resíduos de *N*-acetilglicosamina e ácido *N*-acetilmurâmico (ver Figura 6-28); essa enzima é encontrada nas lágrimas dos seres humanos, onde é presumivelmente uma defesa contra infecções bacterianas nos olhos, e é também produzida por certos vírus de bactérias para garantir que o vírus seja liberado de dentro da célula bacteriana hospedeira, etapa essencial do ciclo de infecção viral. A penicilina e os antibióticos relacionados são bactericidas por impedirem a formação das ligações cruzadas, tornando a parede celular muito fraca para resistir à lise osmótica (ver p. 223).

Certas algas marinhas vermelhas, incluindo algumas macroalgas, têm paredes celulares que contêm **ágar**, mistura de heteropolissacarídeos sulfatados compostos por D-galactose e um derivado de L-galactose, unidos entre C-3 e C-6 por uma ligação éter. O ágar é uma mistura complexa de polissacarídeos, todos com o mesmo esqueleto estrutural, mas sendo substituídos por diferentes quantidades de sulfato e piruvato. A **agarose** ($M_r \sim 150.000$) é o componente do ágar que possui menos grupamentos carregados (sulfatos, piruvatos) (**Figura 7-21**). Sua propriedade singular de formar géis a torna útil nos laboratórios de bioquímica. Quando uma suspensão de agarose em água é aquecida e depois resfriada, a agarose forma uma dupla-hélice: duas moléculas em orientação paralela se enrolam uma na outra, com uma

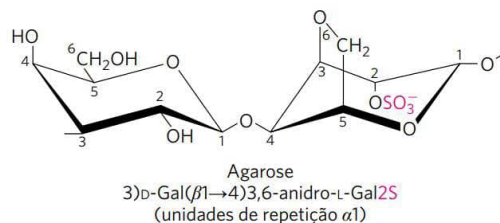
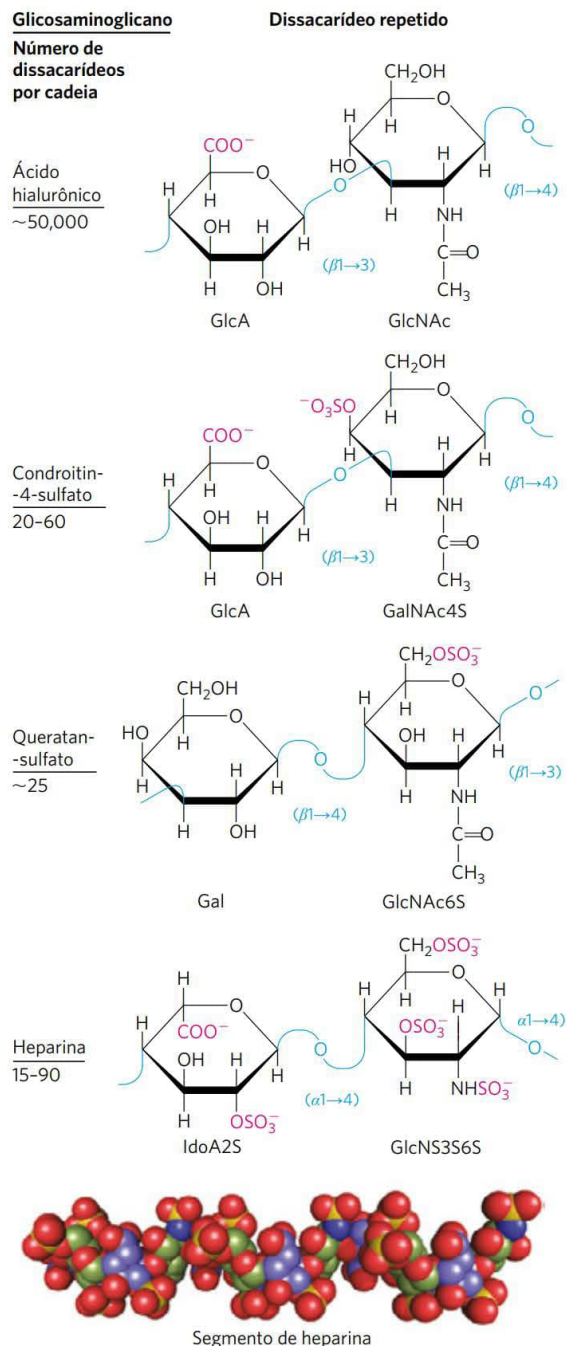


FIGURA 7-21 Agarose. As unidades de repetição na agarose são constituídas por D-galactose unidas por ligação ($\beta 1 \rightarrow 4$) a 3,6-anidro-L-galactose (na qual uma ligação éter conecta C-3 e C-6). Essas unidades são ligadas por ligações glicosídicas ($\alpha 1 \rightarrow 3$), formando polímeros com um comprimento de 600 a 700 resíduos. Uma pequena fração dos resíduos de 3,6-anidro-L-galactose contém um éster de sulfato em C-2 (como mostrado aqui). Os parênteses abertos no nome sistemático indicam que as unidades repetidas estendem-se a partir das duas extremidades.

volta da hélice a cada três resíduos; moléculas de água ficam retidas na cavidade central. Essas estruturas helicoidais se associam umas com as outras para formar um gel – uma matriz tridimensional que retém grandes quantidades de água. Géis de agarose são utilizados como suportes inertes para a separação eletroforética de ácidos nucleicos. O ágar também é utilizado para formar uma superfície para o crescimento de colônias bacterianas. Outra utilidade comercial do ágar é a produção de cápsulas, nas quais alguns medicamentos e vitaminas são encapsulados; o ágar seco dissolve-se prontamente no estômago e é metabolicamente inerte.

Os glicosaminoglicanos são heteropolissacarídeos da matriz extracelular

O espaço extracelular dos tecidos dos animais multicelulares é preenchido com um material semelhante a um gel, a **matriz extracelular (MEC)**, também chamada de substância fundamental, que mantém as células unidas e provê um meio poroso para a difusão de nutrientes e oxigênio para cada célula. A MEC, que circunda fibroblastos e outras células do tecido conectivo, é composta por uma rede entrelaçada de heteropolissacarídeos e proteínas fibrosas, como colágenos fibrilares, elastinas e fibronectinas. A membrana basal é uma MEC especializada sobre a qual se assentam as células epiteliais; ela é constituída por colágenos especializados, lamininas e heteropolissacarídeos. Esses heteropolissacarídeos, os **glicosaminoglicanos**, formam uma família de polímeros lineares compostos por unidades de dissacarídeo repetidas (**Figura 7-22**). Os glicosaminoglicanos são exclusivos de animais e bactérias, não sendo encontrados em plantas. Um dos dois monossacarídeos é obrigatoriamente *N*-acetilglicosamina ou *N*-acetilgalactosamina; o outro, na maioria dos casos, é um ácido urônico, geralmente ácido D-glicurônico ou ácido L-idurônico. Alguns glicosaminoglicanos contêm grupos sulfato esterificados. A combinação dos grupos sulfato com os grupos carboxila dos resíduos de ácido urônico gera uma densidade muito grande de cargas negativas. Para minimizar as forças de repulsão entre grupos vizinhos carregados, essas moléculas adotam uma conformação estendida em solução, formando uma hélice em formato de bastão, na qual os grupos carboxila carregados negativamente se situam em lados alternados da hélice (como mostrado para a heparina na Figura 7-22). O formato de bastão estendido também leva a maior separação possível entre os grupos



sulfato carregados negativamente. O padrão de resíduos de açúcares sulfatados e não sulfatados específicos para cada glicosaminoglicano proporciona seu reconhecimento específico por diferentes ligantes proteicos, os quais se ligam eletrostaticamente aos glicosaminoglicanos. Os glicosaminoglicanos sulfatados são ligados a proteínas extracelulares para formarem proteoglicanos (Seção 7.3).

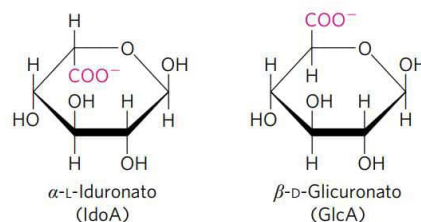
O glicosaminoglicano **ácido hialurônico** (hialuronana) contém resíduos alternados de ácido D-glicurônico e N-acetilglicosamina (Figura 7-22). Contendo até 50 mil repetições da unidade dissacarídica básica, o ácido hialurônico tem massa molecular de alguns milhões; ele forma soluções

FIGURA 7-22 Unidades repetidas de alguns glicosaminoglicanos comuns na matriz extracelular.

Os glicosaminoglicanos são copolímeros de resíduos alternados de ácido urônico e aminoaçúcares (o queratan-sulfato é uma exceção), com ésteres de sulfato presentes em diferentes posições, exceto no ácido hialurônico. Os grupos ionizados carboxilato e sulfato (em vermelho nas fórmulas em perspectiva) criam a alta carga negativa característica destes polímeros. A heparina utilizada terapeuticamente contém principalmente ácido idurônico (IdoA) e uma proporção menor de ácido glicurônico (GlcA, não mostrado), em geral sendo altamente sulfatada e de comprimento heterogêneo. O modelo em volume atômico mostra um segmento da estrutura da heparina em solução, como determinada por espectroscopia de RMN. Os carbonos no sulfato do ácido idurônico estão em azul; os carbonos no sulfato de glicosamina estão em verde. O oxigênio e o enxofre estão representados nas cores vermelho e amarelo, respectivamente. Os átomos de hidrogênio não estão mostrados (para maior clareza). O heparan-sulfato (não mostrado) é similar à heparina, mas contém uma proporção maior de GlcA e menos grupos sulfato, distribuídos em um padrão menos regular. [Fonte: modelo molecular: PDB ID 1HPN, B. Mulloy et al., *Biochem. J.* 293:849, 1993.]

claras, altamente viscosas, que não podem ser comprimidas. Essas soluções funcionam como lubrificantes no líquido sinovial das articulações e geram a consistência gelatinosa do humor vítreo nos olhos dos vertebrados (a palavra grega *hyalos* significa “vidro”; o ácido hialurônico pode ter aparência vítrea ou translúcida). O ácido hialurônico também é um componente da matriz extracelular de cartilagens e tendões, onde auxilia na resistência à tensão e na elasticidade, devido à sua forte interação não covalente com outros componentes da matriz. A hialuronidase, enzima secretada por certas bactérias patogênicas, hidrolisa as ligações glicosídicas do ácido hialurônico, tornando os tecidos mais suscetíveis à infecção bacteriana. Em muitas espécies animais, uma enzima similar presente no espermatozoide hidrolisa o revestimento de glicosaminoglicano que envolve o óvulo, permitindo a penetração do espermatozoide.

Outros glicosaminoglicanos diferem do ácido hialurônico em três aspectos: em geral são polímeros muito mais curtos, estão covalentemente ligados a proteínas específicas (proteoglicanos) e uma ou as duas unidades monoméricas são diferentes daquelas do ácido hialurônico. O **condroitin-sulfato** (do grego, *chondros*, “cartilagem”) auxilia na resistência à tensão apresentada por cartilagens, tendões, ligamentos, válvulas cardíacas e paredes da aorta. O **dermatan-sulfato** (do grego, *derma*, “pele”) auxilia na flexibilidade da pele e está presente em vasos sanguíneos e válvulas cardíacas. Nesse polímero, muitos dos resíduos de glicuronato presentes no condroitin-sulfato estão substituídos por seu epímero em C-5, L-iduronato (IdoA).



Os **queratan-sulfatos** (do grego, *keras*, “chifre”) não contém ácido urônico, e o conteúdo de sulfato é variável. Eles estão presentes em cartilagens, ossos e várias estruturas duras formadas por células mortas: chifres, cabelos, cascos, unhas e garras. O **heparan-sulfato** (do grego,

TABELA 7-2 Estruturas e funções de alguns polissacarídeos

Polímero	Tipo ^a	Unidade de repetição ^b	Tamanho (número de unidades monossacarídicas)	Função/importância
Amido				Armazenamento de energia: em plantas
Amilose	Homo-	($\alpha 1 \rightarrow 4$) Glc, linear	50-5.000	
Amilopectina	Homo-	($\alpha 1 \rightarrow 4$) Glc, com ramificações ($\alpha 1 \rightarrow 6$) Glc a cada 24-30 resíduos	Até 10^6	
Glicogênio	Homo-	($\alpha 1 \rightarrow 4$) Glc, com ramificações ($\alpha 1 \rightarrow 6$) Glc a cada 8-12 resíduos	Até 50.000	Armazenamento de energia: em células bacterianas e animais
Celulose	Homo-	($\beta 1 \rightarrow 4$) Glc	Até 15.000	Estrutural: em plantas, garante rigidez e força às paredes celulares
Quitina	Homo-	($\beta 1 \rightarrow 4$) GlcNAc	Muito grande	Estrutural: em insetos, aranhas e crustáceos, garante rigidez e força ao exoesqueleto
Dextrana	Homo-	($\alpha 1 \rightarrow 6$) Glc, com ramificações ($\alpha 1 \rightarrow 3$)	Vários tamanhos	Estrutural: em bactérias, adesão extracelular
Peptideoglicano	Hetero-; ligado a peptídeos	4)Mur2Ac($\beta 1 \rightarrow 4$) GlcNAc($\beta 1$)	Muito grande	Estrutural: em bactérias, garante rigidez e força ao envelope celular
Agarose	Hetero-	3)D-Gal ($\beta 1 \rightarrow 4$)3,6-anidro-L-Gal($\alpha 1$)	1.000	Estrutural: em algas, material da parede celular
Ácido hialurônico (um glicosaminoglicano)	Hetero-; ácido	4)GlcA ($\beta 1 \rightarrow 3$) GlcNAc($\beta 1$)	Até 100.000	Estrutural: em vertebrados, na matriz extracelular da pele e do tecido conectivo; viscosidade e lubrificação em articulações

^aCada polímero está classificado como um homopolissacarídeo (homo-) ou heteropolissacarídeo (hetero-).

^bOs nomes abreviados das unidades repetidas do peptideoglicano, da agarose e do ácido hialurônico indicam que o polímero contém repetições desta unidade dissacarídica. Por exemplo, no peptideoglicano, o resíduo de GlcNAc de uma unidade dissacarídica está ligado em ($\beta 1 \rightarrow 4$) ao primeiro resíduo da próxima unidade dissacarídica.

hepar, “fígado”; originalmente isolado de fígado de cachorro) é sintetizado por todas as células animais e contém arranjos variados de açúcares sulfatados e não sulfatados. Os segmentos sulfatados da cadeia permitem a interação com um grande número de proteínas, incluindo fatores de crescimento e componentes da matriz extracelular, assim como várias enzimas e fatores presentes no plasma. A heparina é uma forma altamente sulfatada e intracelular do heparan-sulfato, derivada principalmente de mastócitos (um tipo de leucócito, ou célula imune). Seu papel fisiológico não está claro, mas a heparina purificada é utilizada como agente terapêutico para inibir a coagulação do sangue, devido à sua capacidade de se ligar à antitrombina, um inibidor de proteases (ver Figura 7-27).

A Tabela 7-2 descreve a composição, as propriedades, as funções e a ocorrência dos polissacarídeos descritos na Seção 7.2.

RESUMO 7.2 Polissacarídeos

■ Os polissacarídeos (glicanos) servem para o armazenamento de combustível e como componentes estruturais da parede celular e da matriz extracelular.

■ Os homopolissacarídeos amido e glicogênio são formas de armazenamento de combustível em células vegetais, animais e bacterianas. Eles são constituídos por D-glicose com ligações ($\alpha 1 \rightarrow 4$) e ambos contêm algumas ramificações.

■ Os homopolissacarídeos celulose, quitina e dextrana têm funções estruturais. A celulose, composta por resíduos de D-glicose em ligações ($\beta 1 \rightarrow 4$), garante força e rigidez à parede celular de plantas. A quitina, um polímero de N-acetilglicosamina com ligações ($\beta 1 \rightarrow 4$), fortalece o exoesqueleto de artrópodos. A dextrana forma um revestimento aderente ao redor de certas bactérias.

■ Os homopolissacarídeos dobram-se em três dimensões. A forma em cadeira do anel piranose é essencialmente rígida, de modo que a conformação dos polímeros é determinada pela rotação das ligações entre os anéis e o átomo de oxigênio na ligação glicosídica. O amido e o glicogênio formam estruturas helicoidais com ligações de hidrogênio dentro da própria cadeia; a celulose e a quitina formam fitas longas e retas que interagem com as fitas vizinhas.

- As paredes celulares de algas e bactérias são fortalecidas por heteropolissacarídeos – peptideoglicano em bactérias, ágar em algas vermelhas. O dissacarídeo que se repete no peptideoglicano é GlcNAc($\beta 1 \rightarrow 4$)Mur2Ac; no ágar, é D-Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)3,6-anidro-L-Gal.
- Os glicosaminoglicanos são heteropolissacarídeos extracelulares nos quais uma das duas unidades de monossacarídeo é um ácido urônico (o queratan-sulfato é uma exceção) e a outra é um aminoaçúcar *N*-acetilado. Ésteres de sulfato em alguns dos grupos hidroxila e em alguns dos grupos amina de certos resíduos de glicosamina na heparina e no heparan-sulfato dão a esses polímeros uma alta densidade de cargas negativas, forçando-os a adotarem conformações estendidas. Esses polímeros (ácido hialurônico, condroitin-sulfato, dermatan-sulfato e queratan-sulfato) garantem à matriz extracelular viscosidade, adesão e resistência à tensão.

7.3 Glicoconjugados: proteoglicanos, glicoproteínas e glicoesfingolipídeos

Além dos importantes papéis como armazenadores de combustível (amido, glicogênio, dextrana) e como material estrutural (celulose, quitina, peptideoglicanos), os polissacarídeos e os oligossacarídeos são transportadores de informação. Alguns fornecem comunicação entre as células e a matriz extracelular circundante; outros marcam proteínas para o transporte e a localização em organelas específicas, ou para degradação, quando a proteína é malformada ou supérflua; e outros atuam como pontos de reconhecimento para moléculas de sinalização extracelulares (p. ex., fatores de crescimento) ou parasitas extracelulares (bactérias e vírus). Em praticamente todas as células eucarióticas, cadeias de oligossacarídeos específicos ligadas a componentes da membrana plasmática formam uma camada de carboidratos (o glicocálice) com alguns nanômetros de espessura, que serve como uma superfície rica em informações que a célula expõe para o meio exterior. Esses oligossacarídeos são componentes centrais para reconhecimento e adesão entre células, migração celular durante o desenvolvimento, coagulação sanguínea, resposta imune, cicatrização de ferimentos e outros processos celulares. Na maioria desses casos, o carboidrato que carrega a informação está covalentemente ligado a uma proteína ou a um lipídeo, formando um **glicoconjugado**, que é a molécula biologicamente ativa (**Figura 7-23**).

Os **proteoglicanos** são macromoléculas da superfície celular ou da matriz extracelular, nas quais uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos sulfatados estão covalentemente unidas a uma proteína de membrana ou a uma proteína secretada. A cadeia de glicosaminoglicano pode se ligar a proteínas extracelulares por meio de interações eletrostáticas entre a proteína e os açúcares carregados negativamente do proteoglicano. Os proteoglicanos são os principais componentes de todas as matrizes extracelulares.

As **glicoproteínas** são proteínas que contêm um ou alguns oligossacarídeos de complexidades variadas a elas unidos covalentemente. Costumam ser encontradas na superfície externa da membrana plasmática (como parte do glicocálice), na matriz extracelular e no sangue. Nas células, são encontradas em organelas específicas, como complexo

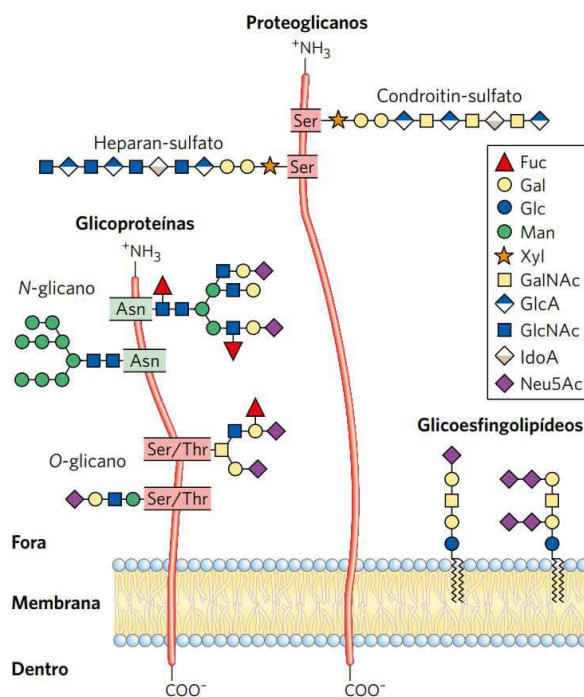


FIGURA 7-23 Glicoconjugados. Estruturas de alguns proteoglicanos, glicoproteínas e glicoesfingolipídeos típicos descritos no texto.

de Golgi, grânulos de secreção e lisossomos. As porções oligossacarídicas das glicoproteínas são muito heterogêneas e, assim como os glicosaminoglicanos, são ricas em informação, formando locais extremamente específicos para o reconhecimento e a ligação de alta afinidade por proteínas ligantes de carboidratos, chamadas de lectinas. Algumas proteínas citosólicas e nucleares também podem ser glicosiladas.

Os **glicoesfingolipídeos** são componentes da membrana plasmática nos quais a cabeça hidrofílica é um oligossacarídeo. Como nas glicoproteínas, os oligossacarídeos servem como pontos específicos para o reconhecimento por lectinas. Os neurônios são ricos em glicoesfingolipídeos, os quais auxiliam na condução nervosa e na formação da mielina. Os glicoesfingolipídeos também são importantes para a transdução de sinal nas células. Esfingolipídeos são discutidos em mais detalhes nos Capítulos 10 e 11.

Os proteoglicanos, macromoléculas presentes na superfície celular e na matriz extracelular, contêm glicosaminoglicanos

Células de mamíferos podem produzir pelo menos 40 tipos de proteoglicanos. Essas moléculas agem como organizadores de tecidos e influenciam várias atividades celulares, como a ativação de fatores de crescimento e a adesão. A unidade básica dos proteoglicanos consiste em um “cerne proteico” (proteína central) com glicosaminoglicanos covalentemente ligados. O ponto para a ligação é um resíduo de Ser, ao qual o glicosaminoglicano é unido por meio de uma ponte tetrassacarídica (**Figura 7-24**). O resíduo de Ser geralmente está na sequência -Ser-Gly-X-Gly- (em que X é um resíduo de aminoácido), embora nem todas as proteínas contendo essa sequência estejam ligadas a um glicosaminoglicano.

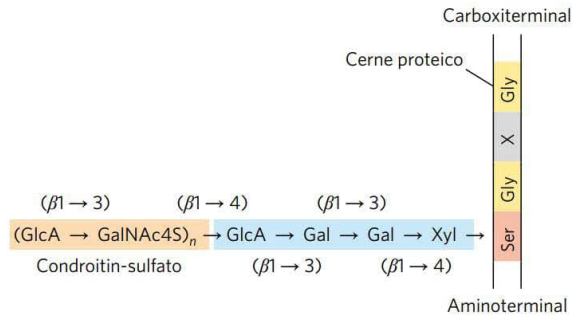


FIGURA 7-24 Estrutura dos proteoglicanos, mostrando a ponte tetrassacarídica. Uma ligação típica tetrassacarídica (em azul) conecta um glicosaminoglicano – neste caso, condroitin-sulfato (em cor de laranja) – a um resíduo de Ser do cerne proteico. O resíduo de xilose na extremidade redutora do ligante é unido por meio do carbono anomérico ao grupo hidroxila do resíduo de Ser.

Muitos proteoglicanos são secretados para a MEC, mas alguns são proteínas integrais de membrana (ver Figura 11-6). Por exemplo, a fina camada da MEC que separa grupos organizados de células de outros grupos (a lâmina basal) contém uma família de proteínas centrais (M_r 20.000 a 40.000), cada qual com algumas cadeias de heparan-sulfato ligadas covalentemente. Existem duas famílias principais de proteoglicanos de membrana ligados a heparan-sulfato. Os **sindecanos** têm um único domínio transmembrana e um domínio extracelular que liga entre três e cinco cadeias de heparan-sulfato e, em alguns casos, condroitin-sulfato (**Figura 7-25a**). Os **glipicanos** são ligados à membrana por uma âncora lipídica, um derivado do lipídeo de membrana fosfatidilinositol (ver Figura 11-13). Os sindecanos e os glipicanos podem ser liberados para o espaço extracelular. Uma protease da MEC capaz de clivar proteínas perto da superfície da membrana libera os ectodomínios de sindecanos (aqueles domínios externos à membrana plasmática), e uma fosfolipase que cliva a conexão com os lipídeos da membrana libera os glipicanos. Esses mecanismos possibilitam que a célula altere rapidamente as características de sua superfície. Esse processo de alteração é altamente regulado e está ativado nas células em proliferação, como células cancerosas. A liberação dos proteoglicanos está envolvida no reconhecimento e na adesão intercelulares e na proliferação e na diferenciação celulares. Numerosos proteoglicanos de condroitin-sulfato e dermatan-sulfato também existem, alguns como moléculas ligadas à membrana plasmática, outros como produtos secretados para a MEC.

As cadeias de glicosaminoglicanos podem se ligar a uma variedade de ligantes extracelulares e, assim, modular a interação do ligante com receptores específicos da superfície celular. Estudos detalhados com heparan-sulfato demonstram que a estrutura dos domínios não é aleatória; alguns domínios (geralmente com o comprimento de 3 a 8 unidades de dissacarídeo) diferem dos domínios vizinhos em sequência e capacidade de ligar proteínas específicas. Domínios altamente sulfatados (chamados de domínios NS) se alternam com domínios que têm resíduos de GlcNAc e GlcA não modificados (domínios *N*-acetilados, ou NA) (**Figura 7-25b**). O padrão exato de sulfatação nos domínios NS depende especificamente do proteoglicano; dado o número de possíveis modificações do dímero GlcNAc-IdoA

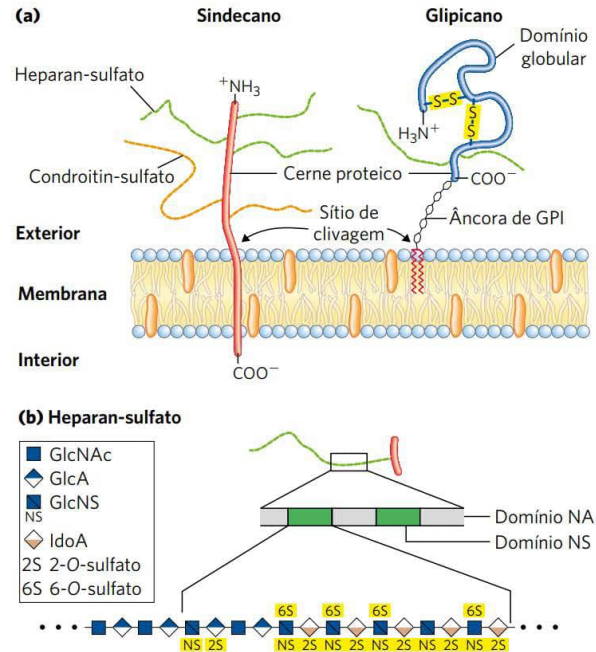
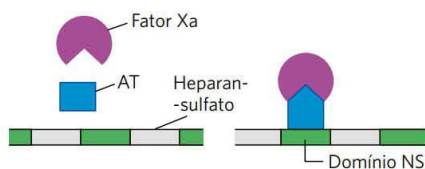


FIGURA 7-25 Duas famílias de proteoglicanos de membrana.

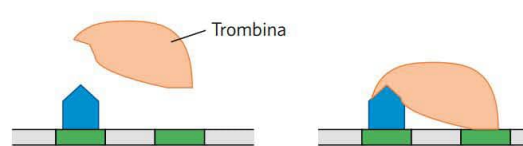
(a) Diagramas esquemáticos de um sindecano e um glipicano na membrana plasmática. Os sindecanos, mantidos na membrana plasmática por interações hidrofóbicas entre uma sequência de resíduos de aminoácidos apolares e lipídeos da membrana plasmática, podem ser liberados por meio de um único corte proteolítico perto da superfície da membrana. Em um sindecano típico, o domínio aminoterminal extracelular está unido covalentemente (por pontes tetrassacarídicas, como as mostradas na Figura 7-24) a três cadeias de heparan-sulfato e duas cadeias de condroitin-sulfato. Os glipicanos são mantidos na membrana por meio de um lipídeo de membrana ligado covalentemente (âncora de GPI; ver Figura 11-13), porém são desprendidos se a ligação entre a porção lipídica da âncora de GPI (fosfatidilinositol) e o oligossacarídeo ligado à proteína for clivada por uma fosfolipase. Todos os glipicanos têm 14 resíduos de Cys conservados, os quais formam ligações dissulfeto que estabilizam a porção proteica, e duas ou três cadeias de glicosaminoglicanos ligadas próximo ao terminal carboxila, em proximidade com a superfície da membrana. **(b)** Ao longo de uma cadeia de heparan-sulfato, regiões ricas em açúcares sulfatados, os domínios NS (em verde) alternam-se com regiões que contêm principalmente resíduos de GlcNAc e GlcA não modificados, os domínios NA (em cinza). Um dos domínios NS está mostrado com mais detalhes para ilustrar a alta densidade dos resíduos modificados: GlcNS (*N*-sulfoglicosamina) com éster de sulfato no C-6, e GlcA e IdoA com éster de sulfato em C-2. O padrão de sulfatação exato dos domínios NS varia entre proteoglicanos. [Fontes: (a) informação obtida de U. Häcker et al., *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6:530, 2005. (b) Informação obtida de J. Turnbull et al., *Trends Cell Biol.* 11:75, 2001.]

(ácido idurônico), são possíveis pelo menos 32 unidades diferentes de dissacarídeo. Além disso, a mesma proteína central pode apresentar diferentes estruturas de heparan-sulfato quando sintetizada em diferentes tipos celulares.

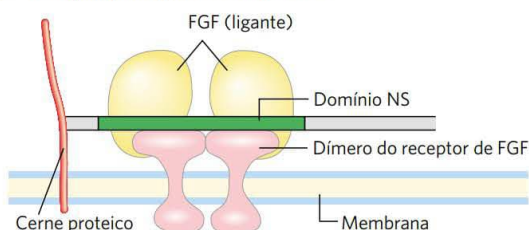
As moléculas de heparan-sulfato com domínios NS precisamente organizados se ligam especificamente a proteínas extracelulares e moléculas de sinalização, causando modificação nas suas atividades, o que pode ser o resultado de uma alteração conformacional na proteína, induzida pela ligação (**Figura 7-26a**), ou ocorrer devido à capacidade de domínios adjacentes do heparan-sulfato de se ligarem a duas proteínas diferentes, aproximando-as e intensificando as interações

(a) Ativação conformacional

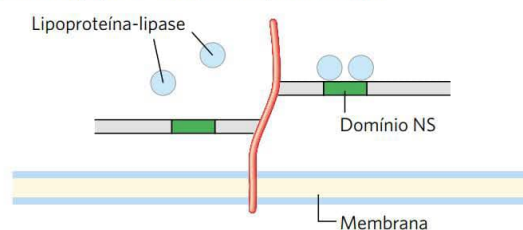
Uma mudança conformacional induzida na proteína antitrombina (AT) após sua ligação a um pentassacarídeo específico no domínio NS permite a interação de AT com o fator Xa da coagulação sanguínea, impedindo a coagulação.

(b) Intensificação da interação proteína-proteína

A ligação de AT e trombina a dois domínios NS adjacentes aproxima as duas proteínas e favorece sua interação, o que inibe a coagulação sanguínea.

(c) Correceptor para ligantes extracelulares

Os domínios NS interagem tanto com o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) quanto com seu receptor, unindo o complexo oligomérico e aumentando a eficácia de baixas concentrações de FGF.

(d) Localização/concentração na superfície celular

A alta densidade de cargas negativas do heparan-sulfato atrai as moléculas de lipoproteína-lipase carregadas positivamente e as retém por meio de interações eletrostáticas e interações de sequência específicas destas com os domínios NS.

FIGURA 7-26 Quatro tipos de proteínas que interagem com os domínios NS do heparan-sulfato. [Fonte: informação obtida de J. Turnbull et al., *Trends Cell Biol.* 11:75, 2001.]

proteína-proteína (Figura 7-26b). Um terceiro mecanismo geral de ação é a ligação de moléculas de sinalização extracelulares (p. ex., fatores de crescimento) ao heparan-sulfato, aumentando a concentração local dessas moléculas e facilitando a interação com os receptores de fatores de crescimento na superfície celular; neste caso, o heparan-sulfato age como correceptor (Figura 7-26c). Por exemplo, o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), proteína sinalizadora extracelular que estimula a divisão celular, liga-se primeiramente à porção heparan-sulfato das moléculas de sindecano da membrana plasmática da célula-alvo. O sindecano apresenta o FGF ao seu receptor da membrana celular, de modo que apenas assim o FGF consegue interagir produtivamente com seu receptor para ativar a divisão celular. Finalmente, em outro tipo de mecanismo, os domínios NS interagem – eletrostaticamente e de outras maneiras – com diversas moléculas extracelulares solúveis, mantendo altas concentrações locais dessas moléculas na superfície celular (Figura 7-26d).

A protease trombina, essencial para a coagulação do sangue (ver Figura 6-41), é inibida por outra proteína sanguínea, a antitrombina, que impede a coagulação prematura do sangue. A antitrombina não se liga à trombina ou a inibe na ausência de heparan-sulfato. Na presença de heparan-sulfato ou heparina, a afinidade da ligação da trombina pela antitrombina aumenta em 2 mil vezes, e a trombina é fortemente inibida. Quando a trombina e a antitrombina são cristalizadas na presença de um curto segmento (16 resíduos) de heparan-sulfato, o segmento de heparan-sulfato carregado negativamente forma pontes entre regiões carregadas positivamente das duas proteínas, causando uma alteração alostérica que inibe a atividade de protease da trombina (Figura 7-27). Os sítios de li-

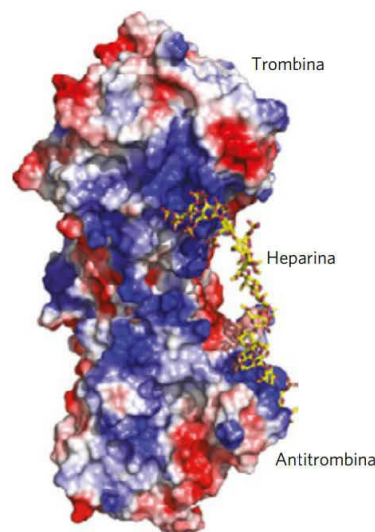


FIGURA 7-27 Bases moleculares para a estimulação da ligação da trombina à antitrombina induzida pelo heparan-sulfato. Nesta estrutura cristalina em que a trombina, a antitrombina e um polímero semelhante ao heparan-sulfato contendo 16 resíduos são cristalizados juntos, os sítios de ligação para o heparan-sulfato em ambas as proteínas são ricos em resíduos de Arg e Lys. Essas regiões carregadas positivamente, mostradas em azul, permitem fortes interações eletrostáticas com os múltiplos sulfatos e carboxilatos carregados negativamente do heparan-sulfato. Como resultado, a afinidade da antitrombina pela trombina é três ordens de magnitude maior na presença de heparan-sulfato do que em sua ausência. Regiões da trombina e da antitrombina ricas em resíduos carregados negativamente são mostradas em vermelho nessa representação eletrostática das duas proteínas. [Fonte: PDB ID 1TB6, W. Li et al., *Nature Struct. Mol. Biol.* 11:857, 2004.]

QUADRO 7-3



MEDICINA

Defeitos na síntese ou na degradação de glicosaminoglicanos sulfatados podem levar a doenças graves em seres humanos

A síntese de glicosaminoglicanos requer enzimas que ativam unidades de monossacarídeos, os transportam através de membranas, condensam os monossacarídeos ativados, formando polissacarídeos, e adicionam sulfato. Mutações em qualquer dessas enzimas em seres humanos podem levar a defeitos estruturais nos glicosaminoglicanos (ou em proteoglicanos formados a partir deles). O resultado pode ser uma ampla variedade de defeitos na sinalização celular, na proliferação celular, na morfogênese tecidual ou em interações com fatores de crescimento (Figura Q-1). Por exemplo, a falha em alongar a unidade dissacarídica GlcNAc-GlcA leva a uma anormalidade óssea, na qual se desenvolvem grandes e múltiplos osteófitos (Figura Q-2).

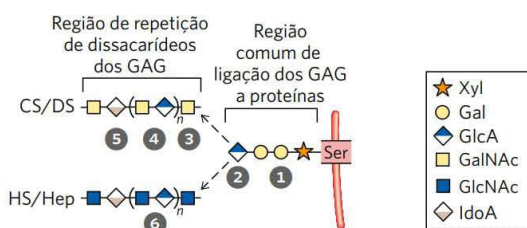


FIGURA Q-1 Um segmento de proteoglicano, mostrando a estrutura normal dos glicosaminoglicanos (GAGs) condroitin-sulfato ou dermatan-sulfato (CS/DS) (parte superior) e heparan-sulfato ou heparina (HS/Hep) (parte inferior), unido através da região de ligação a um resíduo de serina da proteína central. Quando determinada enzima biossintética está ausente por causa de uma mutação, os elementos numerados não podem ser adicionados ao oligossacarídeo em crescimento, e o produto é truncado. Os GAGs disfuncionais resultam em diversos tipos de doenças em seres humanos, dependendo do sítio onde ocorre o problema: ① progéria, tipo síndrome de Ehlers-Danlos – com articulações excessivamente flexíveis, pele frágil e envelhecimento prematuro; ② baixa estatura ou frequentes luxações das articulações; ③ neuropatia (lesão de nervos); ④ defeitos esqueléticos; ⑤ transtorno bipolar ou hérnia diafragmática; e ⑥ deformações ósseas, na forma de grandes osteófitos.



FIGURA Q-2 Deformações ósseas características de osteocondromatose múltipla hereditária, uma doença que resulta da incapacidade genética de adicionar o dissacarídeo GlcNAc-GlcA à cadeia em crescimento de heparan-sulfato ou de heparina (ver ⑥ na Figura Q-1). O crescimento ósseo extra está colorido artificialmente em vermelho nesta imagem por raios X do úmero (osso do braço). [Fonte: CNRI/Science Photo Library/Science Source.]

Quando o defeito ocorre em enzimas da degradação, o acúmulo de glicosaminoglicanos degradados de modo incompleto pode levar a doenças que vão de moderadas, como na síndrome de Scheie, com enrijecimento das articulações, mas inteligência e expectativa de vida normais, a graves, como na síndrome de Hurler, com hipertrofia de órgãos internos, doença cardíaca, nanismo, deficiência intelectual e morte precoce. Os glicosaminoglicanos eram anteriormente denominados mucopolissacarídeos, e doenças causadas por defeitos genéticos em sua degradação ainda são frequentemente denominadas mucopolissacaridoses.

gação para heparan-sulfato e heparina em ambas as proteínas são ricos em resíduos de Arg e Lys; as cargas positivas dos aminoácidos interagem eletrostaticamente com os sulfatos dos glicosaminoglicanos. A antitrombina também inibe duas outras proteínas da coagulação sanguínea (fatores IXa e Xa) por meio de um processo dependente de heparan-sulfato.

A importância de domínios sulfatados corretamente sintetizados no heparan-sulfato é demonstrada no camundongo mutante (“nocaute”) que carece da enzima que sulfata a hidroxila do C-2 do iduronato (IdoA). Esses animais nascem sem os rins e com anormalidades muito graves no desenvolvimento do esqueleto e dos olhos. Outros estudos demonstram que proteoglicanos de membrana são importantes no fígado para a captação de lipoproteínas do sangue. Por fim, há crescentes evidências de que os proteoglicanos contendo heparan-sulfato e condroitin-sulfato

forneçam orientação direcional para o crescimento de axônios, influenciando a via tomada por axônios em desenvolvimento no sistema nervoso.

A importância funcional dos proteoglicanos e dos glicosaminoglicanos a eles associados pode também ser observada nos efeitos de mutações que impedem a síntese ou a degradação desses polímeros em seres humanos (Quadro 7-3).

Alguns proteoglicanos podem formar **agregados proteoglicanos**, enormes grupos supramoleculares de muitas proteínas centrais, todas ligadas a uma única molécula de ácido hialurônico. A proteína central agregana ($M_r \sim 250.000$) tem múltiplas cadeias de condroitin-sulfato e queratan-sulfato unidas a resíduos de Ser da proteína central por meio de ligações trissacarídicas, gerando um número de agregano com M_r de aproximadamente 2×10^6 . Quando uma centena ou mais dessas proteínas centrais

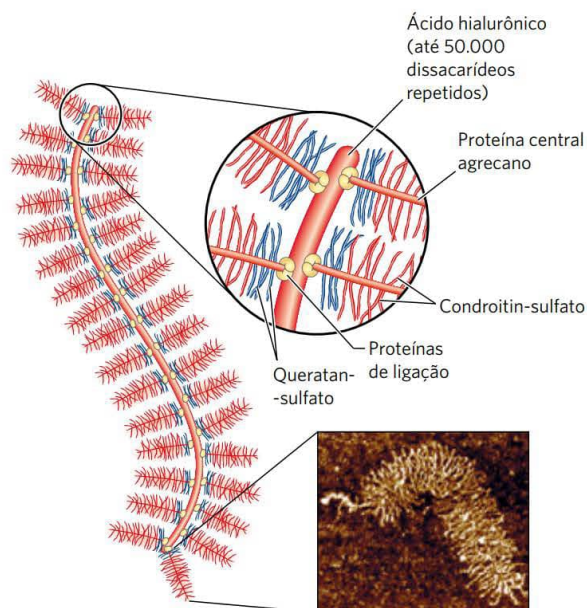


FIGURA 7-28 Agregado proteoglicano da matriz extracelular. Desenho esquemático de um proteoglicano com muitas moléculas de agregcano. Uma molécula muito longa de ácido hialurônico está associada não covalentemente com cerca de 100 moléculas da proteína central agregcano. Cada molécula de agregcano contém muitas cadeias de condroitin-sulfato e queratan-sulfato ligadas covalentemente. Proteínas de ligação nas junções entre cada proteína central e o esqueleto do ácido hialurônico controlam a interação proteína central-ácido hialurônico. A micrografia mostra uma única molécula de agregcano, visualizada com um microscópio de força atômica (ver Quadro 19-2). [Fonte: micrografia por cortesia de Laurel Ng. Reimpressa, com permissão, de Ng, L., Grodzinsky, A., Patwari, P., Sandy, J., Plaas, A. H. K., & Ortiz, C. (2003) Individual cartilage aggrecan macromolecules and their constituent glycosaminoglycans visualized via atomic force microscopy. *J. Struct. Biol.* 143:242-257, Fig. 7a, à esquerda © Elsevier.]

“decoradas” se ligam a uma única molécula estendida de hialuronato (**Figura 7-28**), o agregado proteoglicano resultante ($M_r > 2 \times 10^8$) e a água de hidratação associada ocupam aproximadamente o mesmo volume de uma célula bacteriana. O agregcano interage fortemente com o colágeno da matriz extracelular das cartilagens, contribuindo para o desenvolvimento, a resistência à tensão e a elasticidade desse tecido conectivo.

Entrelaçadas com esses enormes proteoglicanos extracelulares estão as proteínas fibrosas da matriz, como colágeno, elastina e fibronectina, formando uma rede de ligações cruzadas que garantem força e resiliência à toda a matriz extracelular. Algumas dessas proteínas são multiadesivas, uma única proteína apresentando sítios de ligação para diferentes moléculas da matriz. A fibronectina, por exemplo, tem domínios separados que ligam fibrina, heparan-sulfato, colágeno e uma família de proteínas da membrana plasmática, chamadas de integrinas, que medeiam a sinalização entre o interior celular e a matriz extracelular. O quadro geral que emerge de interações célula-matriz (**Figura 7-29**) mostra um arranjo de interações entre moléculas celulares e extracelulares. Essas interações servem não apenas para ancorar as células à matriz extracelular, fornecendo a força e a elasticidade da pele e das articulações, elas também

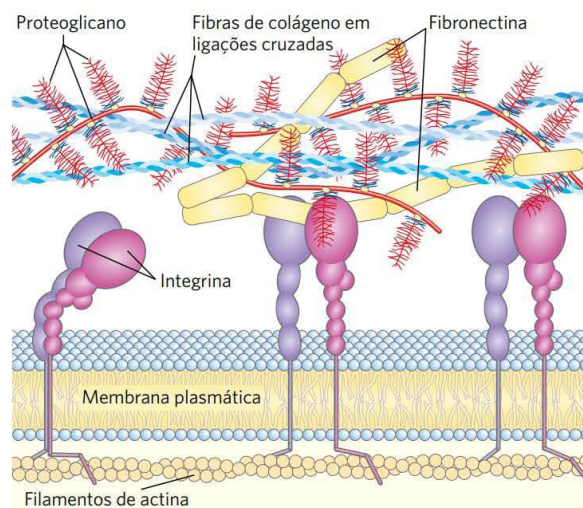


FIGURA 7-29 Interações entre as células e a matriz extracelular.

A associação entre as células e os proteoglicanos da matriz extracelular é mediada por uma proteína de membrana (integrina) e por uma proteína extracelular (fibronectina, neste exemplo) que tem sítios de ligação tanto para integrina quanto para o proteoglicano. Observe a forte associação das fibras de colágeno com a fibronectina e o proteoglicano.

oferecem vias que orientam a migração celular no tecido em desenvolvimento e retransmitem informação em ambos os sentidos através da membrana plasmática.

Glicoproteínas têm oligossacarídeos ligados covalentemente

Glicoproteínas são conjugados entre carboidratos e proteínas nos quais os glicanos são ramificados e menores, além de apresentarem maior diversidade estrutural que os enormes glicosaminoglicanos dos proteoglicanos. O carboidrato é ligado por meio de seu carbono anomérico por uma ligação glicosídica com o —OH de um resíduo de Ser ou Thr (O-ligado) ou por uma ligação N-glicosil com o nitrogênio da amida de um resíduo de Asn (N-ligado) (**Figura 7-30**). Algumas glicoproteínas têm uma única cadeia de oligossacarídeo, porém muitas têm mais de uma; o carboidrato pode constituir de 1 a 70% ou mais da massa da glicoproteína. Aproximadamente metade de todas as proteínas de mamíferos é glicosilada, e cerca de 1% de todos os genes de mamíferos codifica para enzimas envolvidas na síntese e na ligação dessas cadeias de oligossacarídeos. Oligossacarídeos N-ligados são geralmente encontrados na sequência-consenso N-(P)-[ST]; nem todos os sítios potenciais são utilizados. (Ver Quadro 3-2 para convenções da representação de sequências-consenso.) Aparentemente, não existe uma sequência-consenso específica para os oligossacarídeos O-ligados, embora as regiões apresentando cadeias O-ligadas tendam a ser ricas em resíduos de Gly, Val e Pro.

Uma classe peculiar de glicoproteínas é encontrada no citoplasma e no núcleo; nessas proteínas, as posições glicosiladas contêm somente resíduos únicos de N-acetilglicosamina em ligações O-glicosídicas com o grupo hidroxila das cadeias laterais de Ser. Essa modificação é reversível e ocorre frequentemente nos mesmos resíduos de Ser que serão fosforilados em algum estágio da atividade proteica.

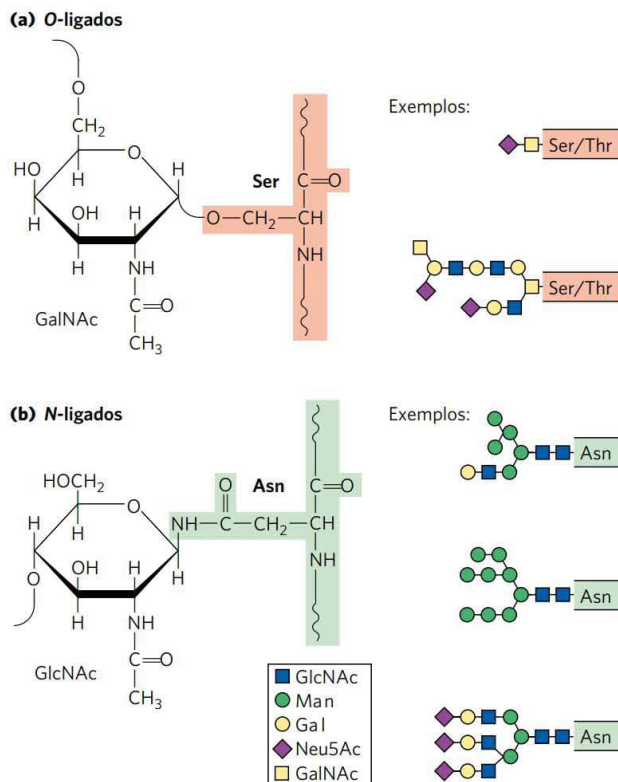


FIGURA 7-30 Ligação de oligossacarídeos a glicoproteínas. **(a)** Os oligossacarídeos O-ligados formam uma ligação glicosídica com o grupo hidroxila de resíduos de Ser ou Thr (em vermelho); a ligação ilustrada aqui apresenta GalNAc como o açúcar da extremidade redutora do oligossacarídeo. Uma cadeia simples e uma cadeia complexa estão mostradas. **(b)** Os oligossacarídeos N-ligados formam uma ligação N-glicosila com o nitrogênio amídico de um resíduo de Asn (em verde); a ligação ilustrada aqui tem GlcNAc como o açúcar terminal. Três tipos comuns de cadeias de oligossacarídeos N-ligadas em glicoproteínas estão mostrados. Uma descrição completa da estrutura do oligossacarídeo requer a especificação da posição e da estereoquímica (α ou β) de cada ligação glicosídica.

As duas modificações são mutuamente exclusivas e este tipo de glicosilação é importante para a regulação da atividade das proteínas. Discutiremos a fosforilação de proteínas amplamente no Capítulo 12.

Como será visto no Capítulo 11, a superfície externa da membrana plasmática tem muitas glicoproteínas de membrana, as quais contêm arranjos de oligossacarídeos ligados covalentemente de complexidade variada. As **mucinas** são glicoproteínas presentes na membrana ou secretadas que podem conter grandes números de cadeias de oligossacarídeos O-ligados. Estão presentes na maioria das secreções, sendo responsáveis pela característica escorregadia do muco.

A caracterização sistemática de todos os carboidratos componentes de uma determinada célula ou tecido, incluindo aqueles ligados a proteínas ou lipídeos, é chamada de **glicômica**. Para as glicoproteínas, isso também significa determinar quais proteínas são glicosiladas e onde, na sequência de aminoácidos, cada oligossacarídeo está ligado. É um trabalho desafiador, mas valoroso, pelo potencial da compreensão dos padrões normais de glicosilação e das for-

mas nas quais eles podem ser alterados durante o desenvolvimento, em doenças genéticas ou no câncer. Os métodos atuais para a caracterização da totalidade dos carboidratos das células dependem muito de aplicações sofisticadas de espectrometria de massas (ver Figura 7-39).

As estruturas de um grande número de oligossacarídeos O e N-ligados de diversas glicoproteínas são conhecidas; as Figuras 7-23 e 7-30 apresentam alguns exemplos típicos. Os mecanismos por meio dos quais proteínas específicas adquirem porções oligossacarídicas serão discutidos no Capítulo 27.

Muitas das proteínas secretadas por células eucarióticas são glicoproteínas, incluindo a maioria das proteínas do sangue. Por exemplo, as imunoglobulinas (anticorpos) e certos hormônios, como o hormônio folículo-estimulante, o hormônio luteinizante e o hormônio estimulante da tireoide, são glicoproteínas. Muitas proteínas do leite, incluindo a principal proteína do soro do leite, a α -lactoalbumina, e algumas das proteínas secretadas pelo pâncreas, como a ribonuclease, são glicosiladas, assim como a maioria das proteínas contidas nos lisossomos.

Aos poucos, as vantagens biológicas da adição de oligossacarídeos a proteínas estão sendo descobertas. Os agrupamentos altamente hidrofílicos de carboidratos alteram a polaridade e a solubilidade das proteínas com as quais estão conjugados. Cadeias de oligossacarídeos ligadas a proteínas que foram recentemente sintetizadas no retículo endoplasmático (RE) e trabalhadas no complexo de Golgi servem como marcadores do destino da proteína e também para o controle da qualidade proteica, marcando proteínas maldobradas para a degradação (ver Figuras 27-41 e 27-42). Quando numerosas cadeias de oligossacarídeos carregadas negativamente se agrupam em uma única região de uma proteína, a repulsão de cargas entre elas favorece a formação de uma estrutura estendida, em forma de bastão, naquela região. O volume e a carga negativa das cadeias de oligossacarídeos também protegem algumas proteínas do ataque por enzimas proteolíticas. Além desses efeitos físicos gerais sobre a estrutura das proteínas, também existem efeitos biológicos específicos induzidos pelas cadeias de oligossacarídeos em glicoproteínas (Seção 7.4). A importância da glicosilação em proteínas torna-se evidente com a descoberta de pelo menos 40 diferentes distúrbios genéticos que afetam a glicosilação em seres humanos. Todos esses distúrbios causam graves problemas no desenvolvimento físico ou mental, sendo às vezes fatal para o indivíduo.

Glicolipídeos e lipopolissacarídeos são componentes de membranas

As glicoproteínas não são os únicos componentes celulares que exibem cadeias de oligossacarídeos; alguns lipídeos também têm oligossacarídeos ligados covalentemente. Os **gangliosídeos** são lipídeos de membrana das células eucarióticas, nos quais o grupo polar, a parte do lipídeo que forma a superfície externa da membrana, é um oligossacarídeo complexo contendo ácido siálico (Figura 7-9) e outros resíduos de monossacarídeos. Algumas das porções oligossacarídicas dos gangliosídeos, como aquelas que determinam os grupos sanguíneos humanos (ver Figura 10-14), são idênticas àsquelas encontradas em certas glicoproteínas, as quais, portanto, também contribuem para o tipo

do grupo sanguíneo. Assim como as porções oligossacarídicas das glicoproteínas, aquelas dos lipídeos de membrana são encontradas comumente, talvez sempre, na superfície externa da membrana plasmática.



Lipopolissacarídeos são as moléculas dominantes da superfície da membrana externa de bactérias gram-negativas, como *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*. Essas moléculas são o principal alvo dos anticorpos produzidos pelo sistema imune dos vertebrados em resposta a uma infecção bacteriana e, por essa razão, são importantes na determinação dos sorotipos das linhagens bacterianas (sorotipos são linhagens distintas pelas propriedades antigênicas). Os lipopolissacarídeos de *S. typhimurium* contêm seis ácidos graxos ligados a dois resíduos de glicosamina, um dos quais é o ponto de

ligação para um oligossacarídeo complexo (**Figura 7-31**). A *E. coli* tem lipopolissacarídeos similares, porém exclusivos. A porção lipídeo A dos lipopolissacarídeos de algumas bactérias é chamada de endotoxina; sua toxicidade para seres humanos e outros animais é responsável pela pressão sanguínea perigosamente baixa que ocorre na síndrome do choque tóxico resultante de infecções por bactérias gram-negativas. ■

RESUMO 7.3 Glicoconjugados: proteoglicanos, glicoproteínas e glicosfingolipídeos

- Os proteoglicanos são glicoconjugados nos quais um ou mais glicanos grandes, chamados de glicosaminoglicanos sulfatados (heparan-sulfato, condroitin-sulfato, dermatan-sulfato ou queratan-sulfato) estão ligados covalentemente a uma proteína central. Unidos à superfície externa da membrana plasmática por meio de um peptídeo transmembrana ou um lipídeo ligado covalentemente, os proteoglicanos fornecem pontos de adesão, reconhecimento e transferência de informação entre as células ou entre as células e a matriz extracelular.
- As glicoproteínas contêm oligossacarídeos ligados covalentemente a resíduos de Asn ou Ser/Thr. Em geral, os glicanos são ramificados e menores do que os glicosaminoglicanos. Muitas proteínas extracelulares ou da superfície celular são glicoproteínas, assim como a maioria das proteínas secretadas. Os oligossacarídeos ligados covalentemente influenciam o enovelamento e a estabilidade das proteínas, fornecem informações cruciais sobre o destino de proteínas recém-sintetizadas e permitem o reconhecimento específico por outras proteínas.
- Glicômica é a determinação da totalidade das moléculas contendo açúcar em uma célula ou tecido, assim como a determinação da função de cada uma dessas moléculas.
- Glicolipídeos e glicosfingolipídeos em plantas e animais e lipopolissacarídeos em bactérias são componentes do envelope celular com cadeias de oligossacarídeos ligadas covalentemente expostas na superfície externa da célula.

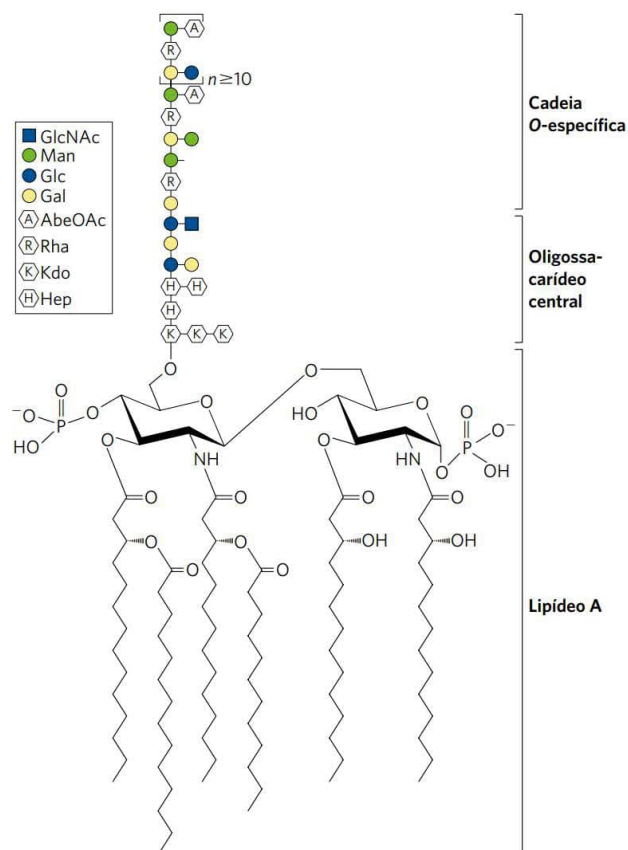


FIGURA 7-31 Lipopolissacarídeos bacterianos. Diagrama esquemático do lipopolissacarídeo da membrana externa de *Salmonella typhimurium*. Kdo é o ácido 3-desóxi-D-mano-octulosônico (antes chamado de ácido cetodesóxi-octônico); Hep é L-glicero-D-mano-heptose; AbeOAc é abequeose (uma 3,6-didesóxi-hexose) acetilada em uma de suas hidroxilas. Diferentes espécies bacterianas têm estruturas de lipopolissacarídeos sutilmente diferentes, embora tenham em comum uma região lipídica (lipídeo A, também conhecido como endotoxina) composta por seis resíduos de ácidos graxos e duas glicosaminas fosforiladas, um oligossacarídeo central e uma cadeia “O-específica”, o principal determinante do sorotipo (reatividade imunológica) da bactéria. As membranas externas das bactérias gram-negativas de *S. typhimurium* e *E. coli* contêm tantas moléculas de lipopolissacarídeos que a superfície celular está quase completamente coberta com cadeias O-específicas.

7.4 Carboidratos como moléculas informativas: o código dos açúcares

A glicobiologia, o estudo da estrutura e da função de glicoconjugados, é uma das mais ativas e excitantes áreas da bioquímica e da biologia celular. Cada vez fica mais claro que as células utilizam oligossacarídeos específicos para codificar informações importantes sobre o destino de proteínas, as interações célula a célula, a diferenciação celular e o desenvolvimento de tecidos, além de os utilizarem como sinais extracelulares. A presente discussão utiliza somente alguns exemplos para ilustrar a diversidade de estruturas e o alcance de atividades biológicas dos glicoconjugados. No Capítulo 20, será discutida a biossíntese de polissacarídeos, e, no Capítulo 27, a associação de cadeias de oligossacarídeos a glicoproteínas.

O aprimoramento dos métodos para a análise da estrutura de oligossacarídeos e polissacarídeos tem revelado a extraordinária complexidade e diversidade dos oligossacarídeos de glicoproteínas e glicolípídeos. Considere as cadeias de oligossacarídeos da Figura 7-30, típicas daquelas encontradas em muitas glicoproteínas. A mais complexa delas contém 14 resíduos de monossacarídeos de quatro tipos diferentes, unidos de várias maneiras, em ligações (1→2), (1→3), (1→4), (1→6), (2→3) e (2→6), alguns com configuração α e alguns com configuração β . Estruturas ramificadas, não encontradas em ácidos nucleicos ou proteínas, são comuns em oligossacarídeos. Com a suposição razoável de que 20 subunidades de monossacarídeos diferentes estão disponíveis para a construção de oligossacarídeos, estima-se que muitos bilhões de oligossacarídeos hexaméricos diferentes sejam possíveis; isso se compara com $6,4 \times 10^7$ (20^6) diferentes hexapeptídeos possíveis com os 20 aminoácidos comuns, e 4.096 (4^6) diferentes hexanucleotídeos possíveis com as quatro subunidades nucleotídicas. Se permitirmos também as variações em oligossacarídeos resultantes da sulfatação de um ou mais dos resíduos, o número de oligossacarídeos possíveis aumenta em duas ordens de magnitude. Na verdade, apenas um subconjunto das possíveis combinações é encontrado, devido às restrições impostas por enzimas biossintéticas e disponibilidade de precursores. Ainda assim, a enorme riqueza de informações na estrutura dos glicanos não somente compete com a dos ácidos nucleicos na densidade de informações contidas em uma molécula de tamanho modesto, mas também a supera em muito. Cada um dos oligossacarídeos representados nas Figuras 7-23 e 7-30 tem configuração tridimensional única – uma palavra no código dos açúcares – e legível para as proteínas com as quais eles interagem.

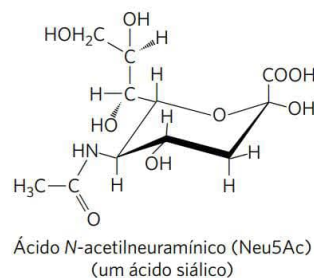
Lectinas são proteínas que leem o código dos açúcares e controlam muitos processos biológicos

As **lectinas**, encontradas em todos os organismos, são proteínas que ligam carboidratos com alta especificidade e com moderada a alta afinidade. Elas participam de vários processos de reconhecimento celular, sinalização e adesão e no endereçamento intracelular de proteínas recentemente sintetizadas. As lectinas de plantas, abundantes em sementes, provavelmente atuam como restridentes para insetos e outros predadores. No laboratório, lectinas vegetais purificadas são reagentes úteis para a detecção e a separação de glicanos e glicoproteínas ligados a diferentes oligossacarídeos. Aqui, serão discutidos apenas alguns exemplos dos papéis das lectinas em células animais.

Alguns hormônios peptídicos que circulam no sangue estão ligados a oligossacarídeos que influenciam fortemente suas meias-vidas na circulação. Os hormônios luteinizante e tireotrofina (hormônios peptídicos produzidos na hipófise) têm oligossacarídeos *N*-ligados que terminam com o dissacarídeo GalNAc4S(β 1→4)GlcNAc, reconhecido por uma lectina (receptor) em hepatócitos. (GalNAc4S é uma *N*-acetilgalactosamina sulfatada no grupo —OH do C-4.) A interação receptor-hormônio é responsável por mediar a internalização e a destruição dos hormônios luteinizante e tireotrofina, reduzindo suas concentrações no sangue.

Como consequência, os níveis sanguíneos desses hormônios passam por periódicas ascensões (devidas à secreção pulsátil pela hipófise) e quedas (devidas à destruição contínua pelos hepatócitos).

Os resíduos de Neu5Ac (um ácido siálico) situados nas extremidades das cadeias de oligossacarídeos de muitas glicoproteínas do plasma (Figura 7-23) protegem essas proteínas da captação e da degradação no fígado. Por exemplo, a ceruloplasmina, glicoproteína sérica que contém cobre, tem algumas cadeias de oligossacarídeo terminando com Neu5Ac. O mecanismo que remove os resíduos de ácido siálico de glicoproteínas séricas não está claro. A remoção pode ser causada pela atividade da enzima neuraminidase (também chamada de sialidase), produzida por organismos invasores ou pela remoção lenta e constante dos resíduos por enzimas extracelulares. A membrana plasmática dos hepatócitos possui moléculas de lectinas (receptoras para assialoglicoproteínas; “assialo” indicando “sem ácido siálico”) que se ligam especificamente a cadeias de oligossacarídeos com resíduos de galactose não mais “protegidos” por um resíduo terminal de Neu5Ac. A interação receptor-ceruloplasmina desencadeia a endocitose e a destruição de ceruloplasmina.



Um mecanismo semelhante é aparentemente responsável pela remoção de eritrócitos “velhos” da corrente sanguínea em mamíferos. Eritrócitos recém-sintetizados têm algumas glicoproteínas de membrana com cadeias de oligossacarídeos que terminam em Neu5Ac. Em laboratório, quando os resíduos de ácido siálico são removidos – coletando-se uma amostra de sangue de animais experimentais, tratando-a com neuraminidase *in vitro* e reintroduzindo-a na circulação –, os eritrócitos tratados desaparecem da circulação em poucas horas; eritrócitos com oligossacarídeos intactos (coletados e reintroduzidos, sem tratamento com neuraminidase) continuam a circular por dias.



Lectinas da superfície celular – tanto lectinas humanas quanto de agentes infecciosos – são importantes no desenvolvimento de algumas doenças. As **selectinas** compõem uma família de lectinas da membrana plasmática que controlam o reconhecimento e a adesão célula a célula em diversos processos celulares. Um desses processos é o movimento das células do sistema imune (leucócitos) através da parede dos capilares, do sangue para os tecidos, em sítios de infecção ou inflamação (Figura 7-32). Em um sítio de infecção, a selectina P da superfície das células endoteliais dos capilares interage com um oligossacarídeo específico das glicoproteínas da superfície dos leucócitos circulantes.

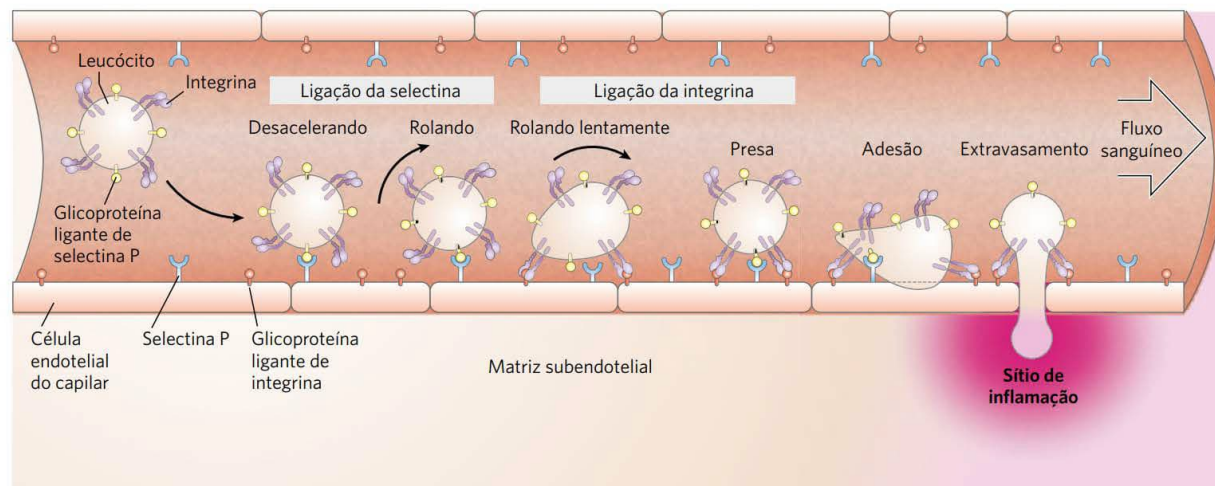


FIGURA 7-32 Função das interações lectina-ligante durante a movimentação de leucócitos para um sítio de infecção ou ferimento. Um leucócito movendo-se ao longo de um capilar é desacelerado por interações transitórias entre moléculas de selectina P da membrana plasmática das células endoteliais do capilar e glicoproteínas ligantes de selectina P da superfície do leucócito. Ao interagir com moléculas de selectina P consecutivas, o leucócito rola sobre a superfície do capilar. Próximo a um sítio de inflamação, interações mais fortes entre integrinas da superfície do leucócito e seus ligantes na superfície do capilar levam a uma adesão firme. O leucócito para de rolar e, sob a influência de sinais enviados a partir do sítio de inflamação, começa a extravasar – escapar através da parede do capilar –, movendo-se em direção ao sítio de inflamação.

Essa interação desacelera os leucócitos que rolam sobre o revestimento endotelial dos capilares. Uma segunda interação, entre moléculas de integrina da membrana plasmática dos leucócitos e uma proteína de adesão da superfície das células endoteliais, detém o leucócito e permite que ele atravesse a parede do capilar, entrando nos tecidos infectados para iniciar o ataque imune. Duas outras selectinas participam dessa “migração dos linfócitos”: a selectina E da célula endotelial e a selectina L do leucócito ligam-se aos oligossacarídeos correspondentes em leucócitos e células endoteliais, respectivamente.

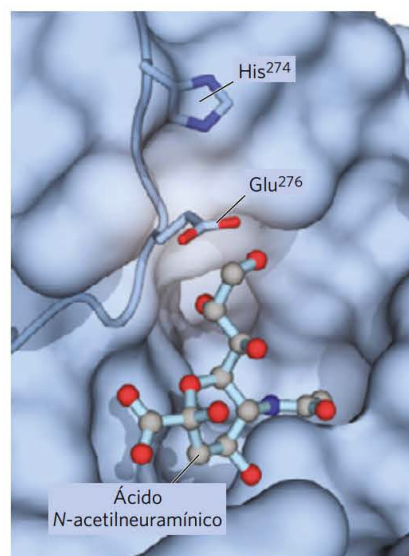
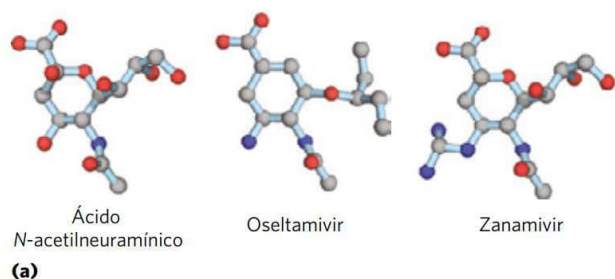
Como as selectinas de seres humanos controlam as respostas inflamatórias na artrite reumatoide, asma, psoríase, esclerose múltipla e rejeição de órgãos transplantados, existe um grande interesse no desenvolvimento de fármacos que inibam a adesão celular mediada por selectinas. Muitos carcinomas expressam um antígeno normalmente presente apenas em células fetais (sialil Lewis x ou sialil Le^x), o qual, quando liberado na circulação, facilita a sobrevivência e a metástase das células tumorais. Derivados de carboidratos que mimetizam a porção sialil Le^x de sialoglicoproteínas ou que alteram a biossíntese desse oligossacarídeo podem se tornar fármacos específicos para selectinas eficazes no tratamento de inflamações crônicas ou doenças metastáticas.

Alguns vírus que infectam animais, incluindo o vírus influenza, aderem às células hospedeiras por meio de interações com os oligossacarídeos presentes na superfície dessas células. A lectina do vírus influenza, conhecida como proteína HA (hemaglutinina), é essencial para a entrada e a infecção viral. Após a entrada e a replicação do vírus em uma célula hospedeira, as partículas virais recém-sintetizadas brotam da célula hospedeira envolvidas em uma porção da membrana plasmática. Uma sialidase (neuraminidase)

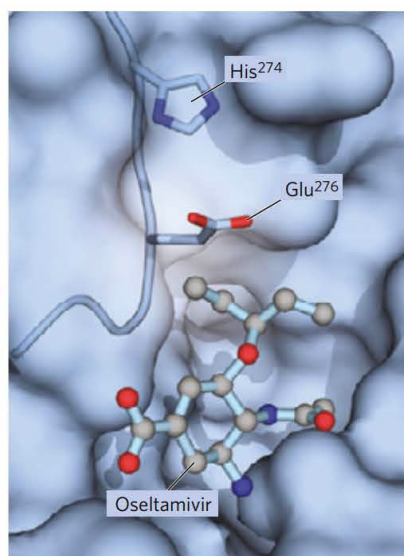
viral remove o resíduo de ácido siálico terminal dos oligossacarídeos da célula hospedeira, liberando as partículas virais da interação com a célula e evitando a agregação de uma partícula com a outra. Outro ciclo de infecção pode, então, começar. Os fármacos antivirais oseltamivir (Tamiflu) e zanamivir (Relenza) são utilizados clinicamente para o tratamento da influenza. Esses fármacos são análogos de açúcares; eles inibem a sialidase viral, pois competem com os oligossacarídeos da célula hospedeira pela ligação (Figura 7-33). Isso impede a liberação do vírus da célula infectada e causa a agregação das partículas virais, efeitos que evitam um novo ciclo de infecção.

Alguns patógenos microbianos têm lectinas que medeiam a adesão bacteriana às células hospedeiras ou a entrada de toxinas nas células. Por exemplo, a bactéria *Helicobacter pylori* tem uma lectina em sua superfície que adere a oligossacarídeos da superfície das células do epitélio que revestem a superfície interna do estômago (Figura 7-34). Entre os sítios de ligação reconhecidos pela lectina da *H. pylori* está o oligossacarídeo Lewis b (Le^b), presente nas glicoproteínas e glicolipídeos que definem o determinante do grupo sanguíneo do tipo O (ver Figura 10-14). Essa observação ajuda a explicar a incidência bem maior de úlceras gástricas em pessoas do tipo sanguíneo O do que naquelas do tipo A ou B; a *H. pylori* ataca as células epiteliais dessas pessoas de maneira mais eficiente. Análogos de oligossacarídeo Le^b sintetizados quimicamente podem se mostrar úteis para o tratamento desse tipo de úlcera. Administrados oralmente, eles poderiam prevenir a adesão bacteriana (e, portanto, a infecção) por competirem com as glicoproteínas gástricas pela ligação à lectina bacteriana.

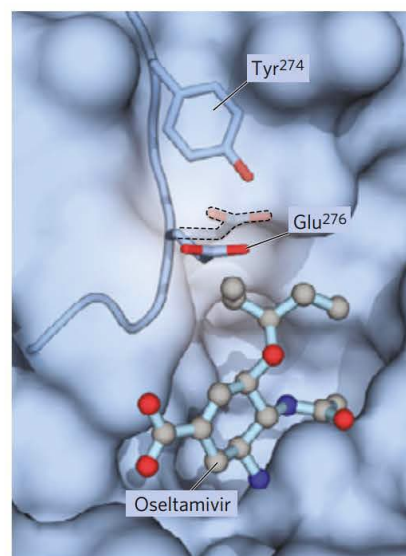
Algumas das mais devastadoras doenças parasitárias humanas, disseminadas em grande parte dos países em



(b)



(c)



(d)

FIGURA 7-33 O sítio de ligação para o ácido N-acetilneuramínico e para o fármaco antiviral oseltamivir na neuraminidase do influenza.

(a) O ligante normal desta enzima é um ácido siálico, o ácido N-acetilneuramínico. Os fármacos oseltamivir e zanamivir ocupam o mesmo sítio da enzima, competitivamente inibindo-a e bloqueando a liberação do vírus pela célula hospedeira. (b) A interação normal com o ácido N-acetilneuramínico no sítio de ligação. (c) O oseltamivir consegue encaixar-se neste sítio, empurrando um resíduo de Glu para fora. (d) Uma mutação no gene da neuraminidase do vírus influenza troca uma His próxima a este resíduo de Glu pela cadeia lateral maior de uma Tyr. Agora, o oseltamivir não consegue empurrar o resíduo de Glu de maneira tão eficaz e se liga de maneira muito menos eficiente ao sítio de ligação, o que torna o vírus mutante efetivamente resistente ao oseltamivir. [Fontes: (b) PDB ID 2BAT, J. N. Varghese et al., *Proteins* 14:327, 1992. (c) PDB ID 2HU4, R. J. Russell et al., *Nature* 443:45, 2006. (d) PDB ID 3CL0, P. J. Collins et al., *Nature* 453:1258, 2008.]

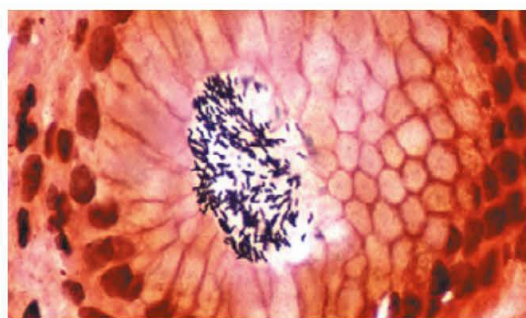


FIGURA 7-34 O desenvolvimento de uma úlcera. Células de *Helicobacter pylori* aderindo-se à superfície gástrica. Essa bactéria causa úlceras por meio das interações entre uma lectina da superfície bacteriana e o oligossacarídeo Le^b (antígeno de grupo sanguíneo) das células epiteliais que revestem a superfície interna do estômago. [Fonte: R. M. Genta/Miraca Life Sciences Research Institute, Irving, Texas, e D. Y. Graham/Veterans Affairs Medical Center, Houston, Texas.]ç

desenvolvimento, são causadas por microrganismos eucarióticos que apresentam na superfície oligossacarídeos incomuns, que, em alguns casos, protegem os parasitas. Entre esses organismos estão os tripanossomos, responsáveis pela doença do sono africana e pela doença de Chagas (ver Quadro 6-3); o *Plasmodium falciparum*, o parasita da malária; e a *Entamoeba histolytica*, o agente causador da disenteria amebóide. A expectativa do descobrimento de fármacos que interfiram com a síntese das cadeias desses oligossacarídeos incomuns e, dessa maneira, com a replicação dos parasitas tem recentemente inspirado muitos trabalhos sobre as rotas de biossíntese desses oligossacarídeos. ■

As lectinas também agem intracelularmente, endereçando proteínas para transporte a localizações celulares específicas (ver Capítulo 27). Por exemplo, um oligossacarídeo contendo manose-6-fosfato, reconhecido por uma lectina,

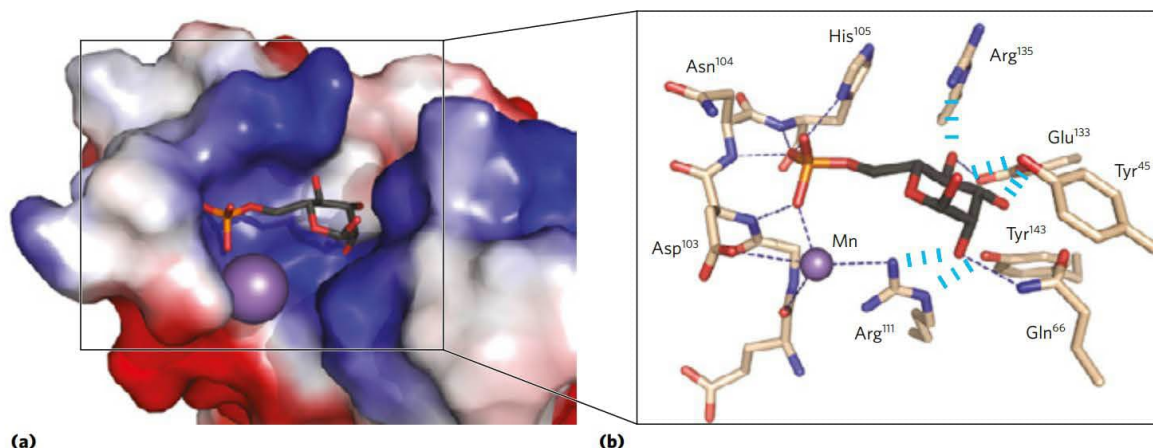


FIGURA 7-35 Detalhes de uma interação lectina-carboidrato. **(a)** Estrutura do receptor de manose-6-fosfato bovino associado com manose-6-fosfato. A proteína está representada pela imagem de contorno da superfície, mostrando a superfície com predominância de carga negativa (em vermelho) ou positiva (em azul). A manose-6-fosfato está representada por uma estrutura em bastão; um íon manganês está representado por uma esfera violeta. **(b)** Uma visão ampliada do sítio de ligação. A manose-6-fosfato é unida por ligações de hidrogênio à Arg¹¹¹ e coordenada ao íon manganês (mostrado menor que seu raio de van der Waals para maior clareza). Cada grupo hidroxila da manose é unido à proteína por meio de ligações de hidrogênio. A His¹⁰⁵, que forma ligações de hidrogênio com um oxigênio do fosfato da manose-6-fosfato, pode ser o resíduo que, quando protonado em pH baixo, induz o receptor a liberar a manose-6-fosfato dentro do lisossomo. [Fonte: (a, b) PDB ID 1M6P, D. L. Roberts et al., *Cell* 93:639, 1998.]

marca proteínas recém-sintetizadas no complexo de Golgi para sua transferência ao lisossomo (ver Figura 27-41).

As interações lectina-carboidrato são altamente específicas e, com frequência, multivalentes

A alta densidade de informações contidas na estrutura dos oligossacarídeos proporciona um código de açúcares com um número praticamente ilimitado de “palavras” pequenas o suficiente para serem lidas por uma única proteína. Nos sítios de ligação a carboidratos, as lectinas têm uma requintada complementaridade molecular que permite a interação somente com os carboidratos correspondentes corretos. O resultado é uma especificidade extremamente alta nessas interações. A afinidade entre um oligossacarídeo e um domínio individual de ligação a carboidratos (DLC) de uma lectina é, algumas vezes, modesta (valores de K_d entre micromolar e milimolar), mas a afinidade real é, em muitos casos, notavelmente aumentada pela multivalência da lectina, na qual uma única molécula de lectina tem múltiplos DLC. Em um agrupamento de oligossacarídeos – como comumente encontrado em uma superfície de membrana, por exemplo –, cada oligossacarídeo pode ocupar um dos DLC da lectina, fortalecendo a interação. Quando as células expressam muitos receptores para lectinas, a força da interação pode ser muito alta, possibilitando eventos altamente cooperativos, como a adesão e o rolamento da célula (Figura 7-32).

Estudos de cristalografia por raios X da estrutura da lectina/receptor de manose-6-fosfato revelam detalhes de sua interação com a manose-6-fosfato que explicam a especificidade da ligação e a função de um cátion divalente na interação lectina-açúcar (Figura 7-35a). A His¹⁰⁵ está formando ligações de hidrogênio com um dos átomos de oxigênio do fosfato (Figura 7-35b). Quando a proteína marcada com manose-6-fosfato chega ao lisossomo (que tem um pH interno

menor do que o do complexo de Golgi), o receptor perde a afinidade pela manose-6-fosfato. A protonação da His¹⁰⁵ pode ser responsável por esta alteração na ligação.

Além dessas interações extremamente específicas, existem interações mais gerais que também contribuem para a ligação de muitos carboidratos às respectivas lectinas. Por exemplo, muitos açúcares têm um lado mais polar e um lado menos polar (Figura 7-36); o lado mais polar forma ligações de hidrogênio com a lectina, ao passo que o lado

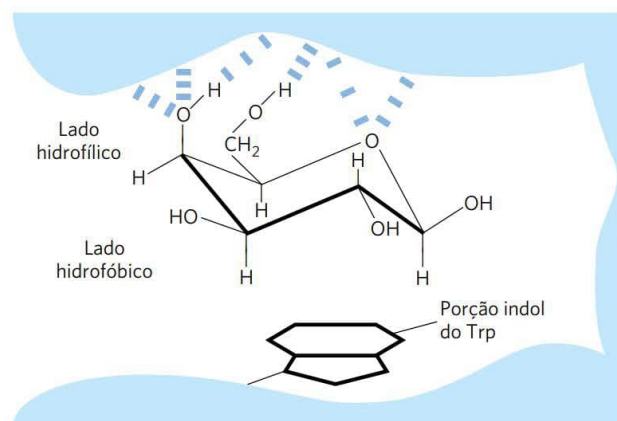


FIGURA 7-36 Interações hidrofóbicas entre resíduos de açúcares.

Unidades de açúcar, como a galactose, têm um lado mais polar (o topo da cadeia mostrada aqui, com o oxigênio do anel e algumas hidroxilas), disponível para a formação de ligações de hidrogênio com a lectina, e um lado menos polar, que pode formar interações hidrofóbicas com cadeias laterais apolares da proteína, como o anel indólico de resíduos de Trp. [Fonte: informação obtida de uma figura fornecida por Dr. C.-W. von der Lieth, Heidelberg; H.-J. Gabius, *Naturwissenschaften* 87:108, 2000, Fig. 6.]

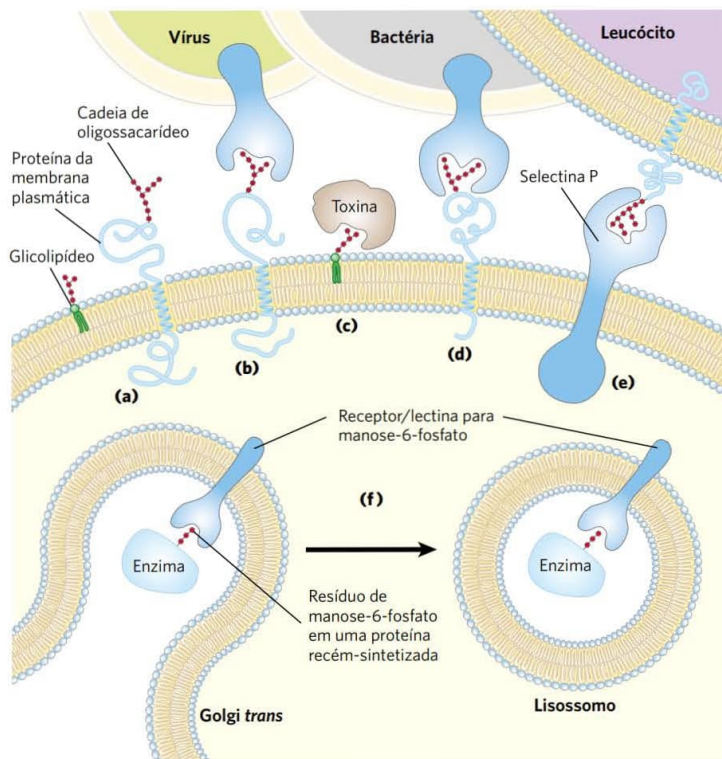


FIGURA 7-37 Funções dos oligossacarídeos nos eventos de reconhecimento na superfície celular e nos sistemas de endomembranas.

(a) Oligossacarídeos com estruturas únicas (representados como correntes de hexágonos em vermelho) são componentes de várias glicoproteínas ou glicolípídeos na superfície externa de membranas plasmáticas. Seus oligossacarídeos se ligam a lectinas do meio extracelular com alta especificidade e alta afinidade. (b) Vírus que infectam células animais, como o vírus da influenza, ligam-se a glicoproteínas da superfície celular na primeira etapa da infecção. (c) Toxinas bacterianas, como as da cólera e da coqueluche, ligam-se a um glicolípídeo da superfície antes de entrarem na célula. (d) Algumas bactérias, como a *H. pylori*, aderem-se a células animais e, então, as colonizam ou infectam. (e) Selectinas (lectinas) da membrana plasmática de certas células medeiam interações célula a célula, como aquelas dos leucócitos com as células endoteliais da parede capilar em um sítio de infecção. (f) O receptor/lectina para manose-6-fosfato do complexo de Golgi *trans* se liga ao oligossacarídeo de enzimas lisossômicas, selecionando-as para transferência ao lisossomo. [Fonte: informação obtida de N. Sharon e H. Lis, *Sci. Am.* 268 (janeiro): 82, 1993.]

menos polar forma interações hidrofóbicas com resíduos de aminoácidos apolares. A soma de todas essas interações produz uma ligação de alta afinidade e garante a alta especificidade das lectinas a seus carboidratos. A interação lectina-carboidrato constitui um modo de transferência de informação que é absolutamente central em muitos processos dentro e entre células. A **Figura 7-37** resume algumas das interações biológicas pelo código dos açúcares.

RESUMO 7.4 Carboidratos como moléculas informativas: o código dos açúcares

- Os monossacarídeos podem ser organizados em uma variedade quase ilimitada de oligossacarídeos, os quais diferem na estereoquímica e na posição das ligações glicosídicas, no tipo e na orientação dos grupos substituintes e no número e no tipo de ramificações. Os glicanos contêm densidade de informação muito maior do que os ácidos nucleicos ou as proteínas.
- As lectinas (proteínas com domínios de ligação a carboidratos com especificidade alta) são comumente encontradas na superfície externa das células, onde iniciam interações com outras células. Em vertebrados, os oligossacarídeos funcionam como etiquetas “lidas” por lectinas e determinam a velocidade de degradação de certos hormônios peptídicos, proteínas da circulação e células sanguíneas.
- Patógenos bacterianos e virais e alguns parasitas eucarióticos aderem-se às células-alvo animais por meio da ligação de lectinas dos patógenos a oligossacarídeos da superfície da célula-alvo.

- A cristalografia por raios X de complexos lectina-açúcar mostra a requintada complementaridade entre as duas moléculas, o que garante a força e a especificidade das interações de lectinas com carboidratos.

7.5 Trabalhando com carboidratos

A crescente compreensão da importância da estrutura dos oligossacarídeos no reconhecimento e na sinalização biológicos tem sido a força motriz por trás do desenvolvimento de métodos para a análise da estrutura e da estereoquímica de oligossacarídeos complexos. A análise de oligossacarídeos é complicada, pois, ao contrário de ácidos nucleicos e proteínas, os oligossacarídeos podem ser ramificados e unidos por diferentes ligações. A densidade alta de cargas de muitos oligossacarídeos e polissacarídeos e a relativa instabilidade dos ésteres de sulfato nos glicosaminoglicanos causam ainda mais dificuldades.

Para polímeros simples, lineares, como a amilose, as posições das ligações glicosídicas são determinadas pelo método clássico de metilação exaustiva: o polímero intacto é tratado com iodeto de metila em meio fortemente básico para a conversão de todas as hidroxilas livres a ésteres de metila estáveis em ácido e, em seguida, o polissacarídeo metilado é hidrolisado em ácido. As únicas hidroxilas livres presentes nos monossacarídeos derivados dessa forma serão aquelas participantes das ligações glicosídicas. Para determinar a sequência dos resíduos de monossacarídeos, incluindo quaisquer ramificações que estejam presentes, exoglicosidases com especificidade conhecida são utilizadas para remover um resíduo de cada vez a partir da(s)

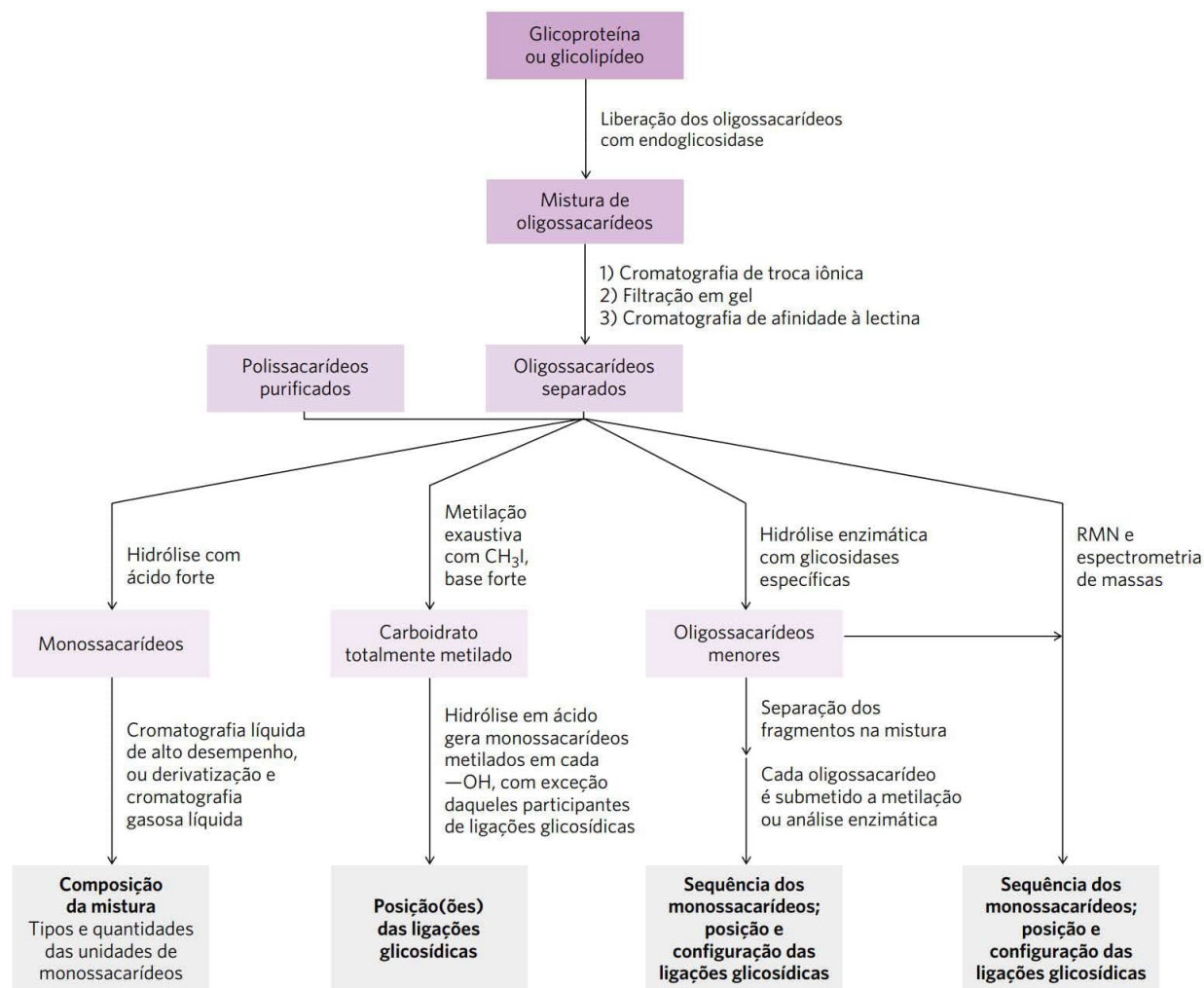


FIGURA 7-38 Métodos para análise de carboidratos. Um carboidrato purificado no primeiro estágio da análise necessita frequentemente de todas as quatro rotas analíticas para a caracterização completa.

extremidade(s) não redutora(s). A especificidade dessas exoglicosidases possibilita muitas vezes a dedução da posição e da estereoquímica das ligações.

Para a análise das porções oligossacarídicas de glicoproteínas e glicolípideos, os oligossacarídeos são liberados por enzimas purificadas – glicosidases, que clivam especificamente oligossacarídeos *O* ou *N*-ligados, ou lipases, que removem grupos da cabeça polar de lipídeos. De modo alternativo, glicanos *O*-ligados podem ser liberados de glicoproteínas pelo tratamento com hidrazina.

As misturas de carboidratos resultantes são separadas em componentes individuais por vários métodos (**Figura 7-38**), incluindo as mesmas técnicas utilizadas para a separação de aminoácidos e proteínas: precipitação fracionada por solventes e cromatografias de troca iônica e exclusão por tamanho (ver **Figura 3-17**). Lectinas altamente purificadas, unidas covalentemente a um suporte insolúvel, são utilizadas comumente em cromatografia de afinidade para carboidratos.

A hidrólise de oligossacarídeos e polissacarídeos em ácido forte origina uma mistura de monossacarídeos, os quais podem ser identificados e quantificados por técnicas cromatográficas para obter a composição total do polímero.

Cada vez mais, a análise de oligossacarídeos baseia-se em espectrometria de massas e espectroscopia por RMN de alta resolução. A espectrometria de massas por desorção e ionização a *laser* assistida por matriz (MALDI MS, do inglês, *matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*) e a espectrometria de massas em tandem (MS/MS), ambas descritas no Capítulo 3, são facilmente aplicadas a compostos polares, como os oligossacarídeos. A MALDI MS é um método muito sensível para a determinação da massa de um íon molecular (neste caso, a cadeia de oligossacarídeo inteira; **Figura 7-39**). A MS/MS revela a massa do íon molecular e de muitos de seus fragmentos, os quais são geralmente o resultado da clivagem das ligações glicosídicas. A análise exclusiva por RMN (ver Quadro 4-5), principalmente para oligossacarídeos de tamanho modera-

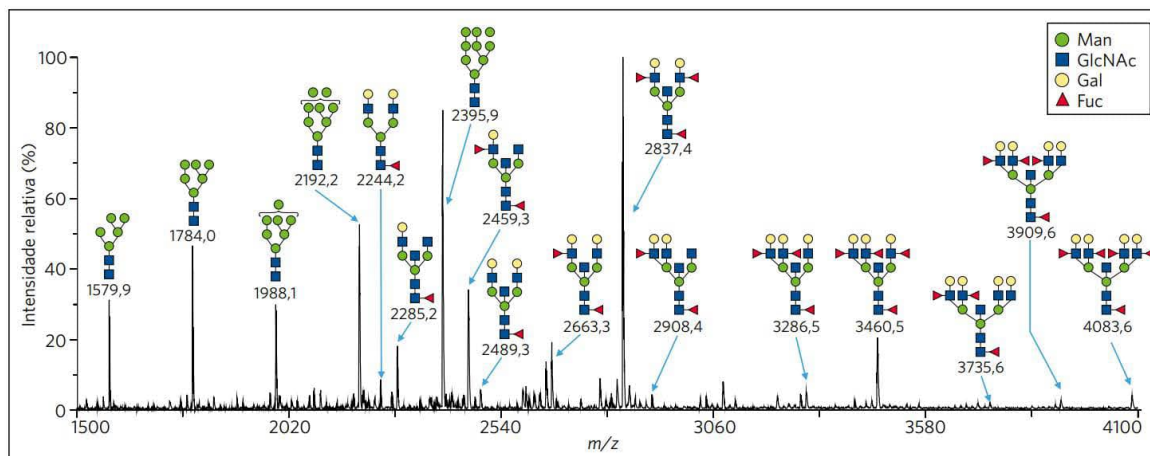


FIGURA 7-39 Separação e quantificação dos oligossacarídeos em um grupo de glicoproteínas. Neste experimento, uma mistura de proteínas extraídas de tecido renal foi tratada para a liberação dos oligossacarídeos a partir das glicoproteínas, e os oligossacarídeos foram analisados por espectrometria de massas por desorção e ionização a laser assistida por matriz (MALDI MS). Cada oligossacarídeo distinto produz um pico em sua massa molecular, e a área sob a curva reflete a quantidade daquele oligossacarídeo. O oligossacarídeo mais proeminente aqui (massa de 2.837,4 u) é composto por 13 resíduos de açúcar; outros oligossacarídeos, contendo desde apenas 7 resíduos até 19 resíduos, também foram separados por este método. [Fonte: cortesia de Anne Dell. Reimpressa, com permissão, de E. M. Comelli et al., *Glycobiology* 16:117, 2006, Fig. 3.]

do, pode gerar muitas informações sobre a sequência, a posição de ligações e a configuração de carbonos anoméricos. Por exemplo, a estrutura do segmento de heparina mostrado na Figura 7-22 em modelo de volume atômico foi obtida por espectroscopia por RMN. Procedimentos automatizados e instrumentos comerciais são utilizados para a determinação rotineira da estrutura de oligossacarídeos, mas o sequenciamento de oligossacarídeos ramificados unidos por mais de um tipo de ligação permanece uma tarefa muito mais árdua do que a determinação de sequências lineares de proteínas e ácidos nucleicos.

Outra ferramenta importante no trabalho com carboidratos é a síntese química, que tem se mostrado uma abordagem eficaz para a compreensão das funções biológicas de glicosaminoglicanos e oligossacarídeos. A química envolvida nessas sínteses é difícil, mas agora os químicos de carboidratos podem sintetizar segmentos curtos de praticamente qualquer glicosaminoglicano – com estereoquímica, comprimento de cadeia e padrão de sulfatação corretos – e oligossacarídeos significativamente mais complexos do que aqueles mostrados na Figura 7-30. A síntese de oligossacarídeos em fase sólida tem como base os mesmos princípios (e possui as mesmas vantagens) que a síntese de peptídeos (ver Figura 3-32), porém requer um conjunto de ferramentas únicas à química de carboidratos: o bloqueio de certos grupos e a ativação de outros grupos, o que permite a síntese de ligações glicosídicas com o grupo hidroxila correto. Atualmente, abordagens sintéticas desse tipo representam uma área de grande interesse, uma vez que é trabalhoso purificar oligossacarídeos específicos em quantidades adequadas a partir de fontes naturais.

Microarranjos de oligossacarídeos são utilizados para a identificação de proteínas com afinidade específica por determinados oligossacarídeos. O princípio é o mesmo dos microarranjos de DNA (Figuras 9-22 e 9-23), porém os problemas técnicos são mais desafiadores. Microgotículas de oligossacarídeos puros são aderidas a uma lâmina

de vidro, e a lâmina é exposta a uma lectina em potencial (proteína ligadora de glicano) que tenha sido marcada com uma molécula fluorescente (Figura 7-40). Após a remoção de toda a proteína não adsorvida, a observação dos microarranjos com um microscópio de fluorescência identifica os oligossacarídeos que a lectina reconheceu, e a quantificação da fluorescência fornece uma estimativa da afinidade entre a lectina e o oligossacarídeo.

RESUMO 7.5 Trabalhando com carboidratos

- O estabelecimento da estrutura completa de oligossacarídeos e polissacarídeos requer a determinação da sequência linear, das posições das ramificações, da configuração de cada unidade de monossacarídeo e das posições das ligações glicosídicas – um problema mais complexo do que a análise de proteínas e ácidos nucleicos.
- As estruturas de oligossacarídeos e polissacarídeos em geral são determinadas por uma combinação de métodos: a hidrólise enzimática específica para determinar a estereoquímica da ligação glicosídica e para produzir fragmentos menores para análises adicionais; a metilação para localizar as ligações glicosídicas; e a clivagem gradual para determinar a sequência e a configuração dos carbonos anoméricos.
- A espectrometria de massas e a espectroscopia por RMN de alta resolução, apropriadas para pequenas amostras de carboidratos, geram informações essenciais sobre sequência, configuração dos carbonos anoméricos e outros carbonos e posições das ligações glicosídicas.
- Métodos para síntese em fase sólida produzem oligossacarídeos específicos muito valiosos na exploração das interações lectina-oligossacarídeo e que têm potencial de se tornarem clinicamente úteis.
- Microarranjos de oligossacarídeos puros são úteis para a determinação da especificidade e da afinidade da ligação das lectinas a oligossacarídeos específicos.

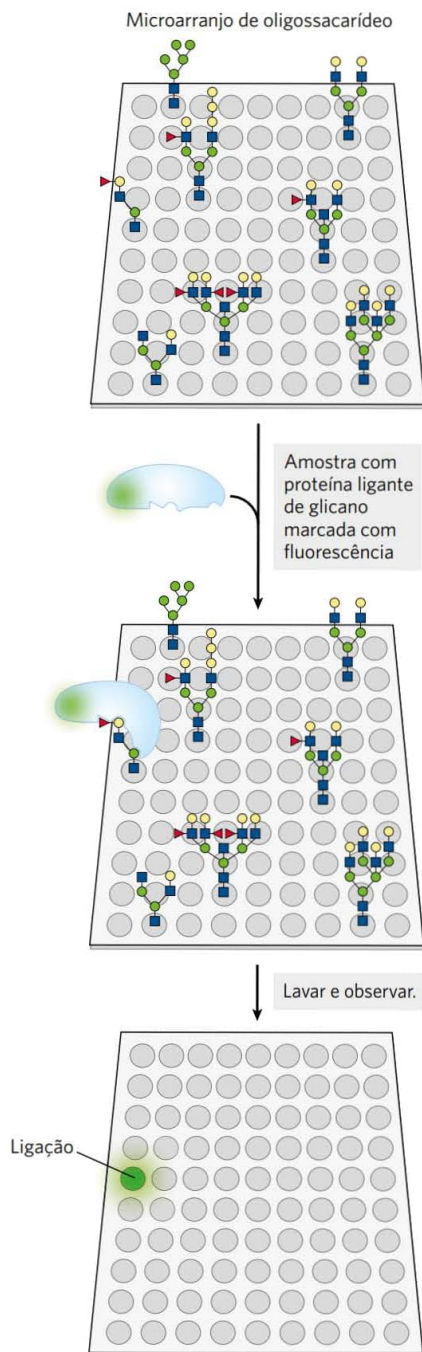


FIGURA 7-40 Microarranjos de oligossacarídeos para determinar a especificidade e a afinidade da ligação das lectinas a carboidratos. Soluções de amostras de oligossacarídeos puros, sintetizados ou isolados da natureza, são colocadas em gotículas microscópicas sobre uma lâmina de vidro e aderidas por meio de um espaçador inerte. Cada ponto representa um oligossacarídeo diferente. A amostra de proteína a ser testada para sua afinidade por oligossacarídeos é primeiramente conjugada a um marcador fluorescente, e, então, a amostra é vertida sobre a lâmina, equilibrada, e qualquer proteína não adsorvida é removida. A observação do microarranjo com um microscópio de fluorescência mostra quais pontos apresentam proteína adsorvida (brilham em verde), e a análise da intensidade de fluorescência permite uma estimativa grosseira da afinidade da ligação proteína-oligossacarídeo. [Fonte: informação obtida de P. H. Seeberger, *Nature Chem. Biol.* 5:368, 2009, Fig. 2a.]

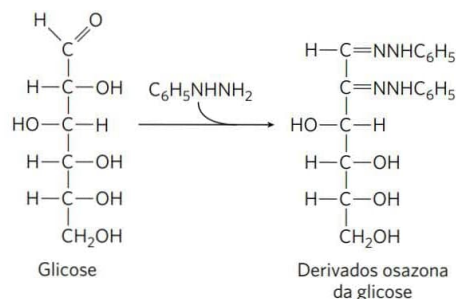
Termos-chave

Termos em negrito estão definidos no glossário.

glicoconjugado 241	extremidade redutora 250
carboidrato 241	glicano 252
monossacarídeo 241	homopolissacarídeo 252
oligossacarídeo 241	heteropolissacarídeo 252
dissacarídeo 241	amido 253
polissacarídeo 241	glicogênio 254
aldose 242	celulose 255
cetose 242	matriz extracelular (MEC) 258
fórmulas de projeção de Fischer 242	glicosaminoglicano 258
epímeros 243	ácido hialurônico 259
hemiacetais 243	condroitin-sulfato 259
hemicetais 243	heparan-sulfato 259
anômeros 243	proteoglicano 261
carbono anomérico 243	glicoproteína 261
piranose 245	glicosfingolipídeo 261
furanose 245	sindecano 262
fórmulas em perspectiva de Haworth 245	glipicano 262
mutarrotação 246	glicômica 266
glicação da hemoglobina 248	lectina 268
açúcar redutor 249	selectinas 268
ligações O-glicosídicas 250	microarranjos de oligossacarídeos 274

Teste seu conhecimento

- 1. Álcool-açúcares** Nos derivados de monossacarídeos conhecidos como álcool-açúcares, o oxigênio da carbonila está reduzido a um grupo hidroxila. Por exemplo, o D-gliceraldeído pode ser reduzido a glicerol. Entretanto, este açúcar não é mais designado D ou L. Por quê?
- 2. Reconhecendo epímeros** Usando a Figura 7-3, identifique os epímeros de (a) D-alose, (b) D-gulose e (c) D-ribose em C-2, C-3 e C-4.
- 3. Pontos de fusão de derivados osazona de monossacarídeos** Muitos carboidratos reagem com fenilhidrazina ($C_6H_5NHNH_2$) para formar derivados cristalinos de cor amarelo-brilhante conhecidos como osazonas:



As temperaturas de fusão desses derivados são facilmente determinadas e são características para cada osazona. Essas informações foram utilizadas para auxiliar na identificação de monossacarídeos antes do desenvolvimento de HPLC ou de

cromatografia gasosa. Estão listados abaixo os pontos de fusão (PFs) de alguns derivados aldose-osazona.

Monossacarídeo	PF do monossacarídeo anidro (°C)	PF do derivado osazona (°C)
Glicose	146	205
Manose	132	205
Galactose	165-168	201
Talose	128-130	201

Como a tabela mostra, certos pares de derivados têm os mesmos pontos de fusão, embora os monossacarídeos originais tenham PFs distintos. Por que glicose e manose, e semelhante galactose e talose, formam derivados osazona com o mesmo ponto de fusão?

4. Configuração e conformação Quais ligações na α -D-glicose devem ser rompidas para que sua configuração mude para β -D-glicose? Quais ligações devem ser rompidas para converter D-glicose a D-manose? Quais ligações convertem uma forma de D-glicose em “cadeira” à outra?

5. Desoxiaçúcares A D-2-desoxigalactose é a mesma molécula química que a D-2-desoxiglicose? Explique.

6. Estruturas de açúcares Descreva as características estruturais comuns e as diferenças para cada um dos seguintes pares: (a) celulose e glicogênio; (b) D-glicose e D-frutose; (c) maltose e sacarose.

7. Açúcares redutores Desenhe a fórmula estrutural para a α -D-glicosil-(1 \rightarrow 6)-D-manosamina e circule a parte dessa estrutura que torna o composto um açúcar redutor.

8. Hemiacetal e ligações glicosídicas Explique a diferença entre um hemiacetal e um glicosídeo.

9. Um sabor de mel A frutose do mel está principalmente na forma β -D-pirano. Este é um dos carboidratos mais doces que se conhece, em torno de duas vezes mais doce do que a glicose; a forma β -D-furanose da frutose é muito menos doce. A doçura do mel diminui gradualmente em altas temperaturas. Também o xarope de milho com alto conteúdo de frutose (produto comercial no qual muito da glicose do xarope de milho é convertido em frutose) é utilizado para adoçar bebidas frias, mas não *quentes*. Que propriedade química da frutose poderia ser responsável por essas duas observações?



10. A glicose-oxidase na determinação da glicose sanguínea A enzima glicose-oxidase isolada do fungo *Penicillium notatum* catalisa a oxidação da β -D-glicose a D-glicono- δ -lactona. Essa enzima é altamente específica para o anômero β da glicose e não afeta o anômero α . Apesar dessa especificidade, a reação catalisada pela glicose-oxidase é comumente utilizada em um ensaio clínico para determinar a glicose sanguínea total – isto é, para soluções contendo uma mistura de α e D-glicose. Quais são as condições necessárias para tornar isso possível? Além de possibilitar a detecção de pequenas quantidades de glicose, que vantagem a glicose-oxidase oferece sobre o reagente de Fehling para a dosagem de glicose sanguínea?

11. A invertase “inverte” a sacarose Embora a sacarose seja bastante doce, uma mistura equimolecular dos monossacarídeos que a constituem, D-glicose e D-frutose, é ainda mais doce. Além de aumentar o grau de doçura, a frutose tem propriedades higroscópicas que favorecem a textura dos alimentos, reduzindo a cristalização e aumentando a umidificação.

Na indústria de alimentos, a sacarose hidrolisada é denominada açúcar invertido, e a enzima que a hidrolisa, obtida de fungos, é chamada de invertase. A reação de hidrólise é geralmente monitorada medindo-se a rotação específica da solução, que é positiva (+ 66,4°) para a sacarose, mas torna-se negativa (sofre uma inversão) na medida em que são formadas quantidades cada vez maiores de D-glicose (rotação específica = +52,7°) e D-frutose (rotação específica = -92°).

A partir do que sabe sobre a química da ligação glicosídica, como você hidrolisaria a sacarose para produzir açúcar invertido de modo não enzimático em sua cozinha?

12. Fabricação de chocolates com recheio líquido

A manufatura de chocolates contendo um centro líquido é uma interessante aplicação da engenharia enzimática. O recheio líquido consiste principalmente em uma solução aquosa de açúcares, rica em frutose para garantir a doçura. O dilema técnico é o seguinte: o revestimento de chocolate deve ser preparado vertendo chocolate derretido quente sobre um centro sólido (ou quase sólido), ainda que o produto final deva ter um centro líquido, rico em frutose. Sugira uma maneira para resolver esse problema. (Dica: a sacarose é muito menos solúvel do que uma mistura de glicose e frutose.)

13. Anômeros da sacarose? A lactose existe em duas formas anoméricas, mas nenhuma forma anomérica da sacarose é conhecida. Por quê?

14. Gentiobiose Gentiobiose (D-Glc(β 1 \rightarrow 6)D-Glc) é um dissacarídeo encontrado em alguns glicosídeos vegetais. Desenhe a estrutura da gentiobiose com base em seu nome abreviado. A gentiobiose é um açúcar redutor? Sofre mutarrotação?

15. Identificação de açúcares redutores A N-acetil- β -D-glicosamina (Figura 7-9) é um açúcar redutor? E o D-gliconato? O dissacarídeo GlcN(α 1 \rightarrow 1 α)Glc é um açúcar redutor?

16. Digestão da celulose A celulose poderia ser uma forma de glicose extremamente abundante e barata, porém os seres humanos não conseguem digeri-la. Por quê? Se lhe oferecessem uma maneira que permitisse adquirir esta capacidade, você aceitaria ou não, e por qual motivo?

17. Propriedades físicas da celulose e do glicogênio

A celulose praticamente pura obtida dos fios das sementes de *Gossypium* (algodão) é resistente, fibrosa e completamente insolúvel em água. Em contrapartida, o glicogênio extraído de músculo ou fígado se dispersa prontamente em água quente, formando uma solução turva. Apesar das propriedades físicas notavelmente diferentes, ambas as substâncias são polímeros de D-glicose em ligações (1 \rightarrow 4) com massa molecular comparável. Quais características estruturais desses dois polissacarídeos geram suas diferentes propriedades físicas? Explique as vantagens biológicas das respectivas propriedades de cada polímero.

18. Dimensões de um polissacarídeo Compare as dimensões de uma molécula de celulose e uma molécula de amilose, cada uma com M_r de 200.000.

19. Velocidade de crescimento do bambu Os caules do bambu, uma gramínea tropical, podem crescer a 0,3 m/dia sob condições ótimas. Dado que os caules são compostos quase que inteiramente por fibras de celulose orientadas no sentido do crescimento, calcule o número de resíduos de açúcar que devem ser enzimaticamente adicionados às cadeias crescentes de celulose a cada segundo para produzir essa velocidade de crescimento. Cada unidade de D-glicose contribui com aproximadamente 0,5 nm para o comprimento de uma molécula de celulose.

20. Glicogênio como armazenamento de energia: por quanto tempo uma ave cinagética consegue voar? Desde a antiguidade, tem-se observado que certas aves cinagéticas, como o galo silvestre, a codorna e o faisão, são facilmente levadas à fadiga. O historiador grego Xenofonte escreveu: “As abetardas... podem ser capturadas se o caçador for rápido em espantá-las para que voem, pois elas apenas voarão por uma curta distância, como as perdizes, e logo cansarão; e sua carne é deliciosa”. Os músculos de voo das aves cinagéticas dependem quase que inteiramente do uso de glicose-1-fosfato para energia, na forma de ATP (ver Capítulo 14). A glicose-1-fosfato é produzida pela clivagem do glicogênio armazenado no músculo, catalisada pela enzima glicogênio-fosforilase. A velocidade de produção de ATP é limitada pela velocidade na qual o glicogênio pode ser degradado. Durante um “voo de pânico”, a velocidade de clivagem do glicogênio das aves de caça é bastante alta, cerca de 120 $\mu\text{mol}/\text{min}$ de glicose-1-fosfato produzidos por grama de tecido. Dado que os músculos de voo normalmente contêm aproximadamente 0,35% de glicogênio por peso, calcule por quanto tempo uma ave cinagética pode voar. (Considere a massa molecular média de um resíduo de glicose no glicogênio como 162 g/mol.)

21. Estabilidade relativa de dois confôrmeros Explique por que as duas estruturas mostradas na Figura 7-18b são tão diferentes energeticamente (em estabilidade). Dica: ver Figura 1-23.

22. Volume do condroitin-sulfato em solução Uma função crucial do condroitin-sulfato é agir como lubrificante em articulações esqueléticas pela criação de um meio gelatinoso elástico e resistente à fricção e ao choque. Essa função parece estar relacionada a uma propriedade peculiar do condroitin-sulfato: o volume ocupado por uma molécula é muito maior em solução do que quando em sólido desidratado. Por que o volume é tão maior em solução?



23. Interações da heparina A heparina, um glicosaminoglicano carregado negativamente, é utilizada como anticoagulante. Ela age pela ligação a algumas proteínas plasmáticas, incluindo antitrombina III, um inibidor da coagulação sanguínea. A ligação 1:1 da heparina à antitrombina III parece causar uma alteração na conformação da proteína que aumenta bastante sua capacidade de inibir a coagulação. Quais resíduos de aminoácidos da antitrombina III provavelmente interagem com a heparina?

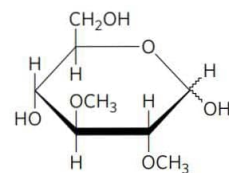
24. Permutações de um trissacarídeo Pense sobre como estimar o número de possíveis trissacarídeos compostos por *N*-acetilglicosamina-4-sulfato (GlcNAc4S) e ácido glicurônico (GlcA) e desenhe 10 deles.

25. Efeito do ácido siálico sobre eletroforese em gel de poli(acrilamida) com SDS Suponha que você tem quatro formas de uma proteína, todas com seqüências de aminoácidos idênticas, porém contendo zero, uma, duas ou três cadeias de oligossacarídeos, cada qual terminando com um único resíduo de ácido siálico. Desenhe o padrão que você esperaria em um gel caso uma mistura dessas quatro glicoproteínas fosse separada por eletroforese em gel de poli(acrilamida) com SDS (ver Figura 3-18) e corada para proteínas. Identifique todas as bandas em seu desenho.

26. Conteúdo de informação dos oligossacarídeos A porção carboidrato de algumas glicoproteínas pode servir como um sítio para o reconhecimento celular. Para desempenhar esta função, os oligossacarídeos devem ter o potencial para existir em uma grande variedade de formas. O que pode-

ria produzir uma maior variedade de estruturas: oligopeptídeos ou compostos por cinco diferentes resíduos de aminoácidos ou oligossacarídeos compostos por cinco resíduos de monossacarídeos diferentes? Explique.

27. Determinação do conteúdo de ramificações na amilopectina A quantidade de ramificações (número de ligações glicosídicas ($\alpha 1 \rightarrow 6$)) na amilopectina pode ser determinada pelo seguinte procedimento: uma amostra de amilopectina é metilada exaustivamente – tratada com um agente metilante (iodeto de metila) que substitui o hidrogênio de cada hidroxila dos resíduos de glicose por um grupo metila, convertendo $-\text{OH}$ em $-\text{OCH}_3$. Todas as ligações glicosídicas na amostra tratada são, então, hidrolisadas em uma solução aquosa ácida, e a quantidade de 2,3-di-*O*-metilglicose assim formada é determinada.



2,3-Di-*O*-metilglicose

- Explique o princípio desse procedimento para a determinação do número de pontos de ramificação ($\alpha 1 \rightarrow 6$) na amilopectina. O que acontece com os resíduos de glicose não ramificados da amilopectina durante o processo de metilação e hidrólise?
- Uma amostra de 258 mg de amilopectina tratada como descrito acima produziu 12,4 mg de 2,3-di-*O*-metilglicose. Determine a porcentagem de resíduos de glicose da amilopectina que continha uma ramificação ($\alpha 1 \rightarrow 6$). (Assuma que a massa molecular média de um resíduo de glicose na amilopectina é de 162 g/mol.)

28. Análise estrutural de um polissacarídeo Um polissacarídeo de estrutura desconhecida foi isolado, submetido à metilação exaustiva e hidrolisado. A análise dos produtos mostrou três açúcares metilados: 2,3,4-tri-*O*-metil-D-glicose, 2,4-di-*O*-metil-D-glicose e 2,3,4,6-tetra-*O*-metil-D-glicose, na proporção 20:1:1. Qual é a estrutura do polissacarídeo?

Problema de análise de dados

29. Determinação da estrutura dos antígenos do grupo sanguíneo ABO O sistema ABO dos grupos sanguíneos humanos foi descoberto em 1901, e, em 1924, foi mostrado que esta característica é herdada em um único *locus* gênico com três alelos. Em 1960, W. T. J. Morgan publicou um artigo revisando o que era conhecido sobre a estrutura das moléculas dos antígenos ABO naquela época. Quando o artigo foi publicado, as estruturas completas dos antígenos A, B e O ainda não eram conhecidas; esse artigo é um exemplo da “construção” do conhecimento científico.

Em qualquer tentativa para determinar a estrutura de um composto biológico desconhecido, os pesquisadores devem lidar com dois problemas fundamentais: (1) se você não sabe o que a *substância* é, como sabe que *ela* está pura? (2) Se você não sabe o que a *substância* é, como sabe que as condições de extração e purificação não alteraram *sua* estrutura? Morgan examinou o problema (1) por meio de alguns métodos. Um método é descrito em seu artigo como observação de “valores analíticos constantes após testes de solubilização fracionada”

(p. 312). Neste caso, “valores analíticos” são medidas de composição química, ponto de fusão, e assim por diante.

- (a) Com base em seu entendimento das técnicas químicas, o que Morgan quis dizer com “testes de solubilização fracionada”?
- (b) Por que os valores analíticos obtidos de testes de solubilização fracionada de uma substância *pura* seriam constantes e aqueles de uma substância *impura* não seriam constantes?

Morgan examinou o problema (2) utilizando um ensaio que mede a atividade imunológica da substância presente em diferentes amostras.

- (c) Por que era importante para os estudos de Morgan, e especialmente para examinar o problema (2), que este ensaio de atividade fosse quantitativo (medindo o nível de atividade), em vez de simplesmente qualitativo (determinando a presença ou a ausência da substância)?

A estrutura dos antígenos do grupo sanguíneo está mostrada na Figura 10-14. Em seu artigo, Morgan listou algumas propriedades dos três antígenos, A, B e O, que eram conhecidas naquela época (p. 314):

1. O antígeno do tipo B tem um conteúdo de galactose maior do que os antígenos A ou O.
 2. O antígeno do tipo A contém mais aminoaçúcares do que os antígenos B ou O.
 3. A razão glicosamina/galactosamina para o antígeno A é aproximadamente 1,2, e para o antígeno B é cerca de 2,5.
- (d) Qual(is) dessas conclusões é(são) consistente(s) com as estruturas conhecidas dos antígenos do grupo sanguíneo?
 - (e) Como você explicaria as discrepâncias entre os resultados de Morgan e as estruturas conhecidas?

Em um trabalho posterior, Morgan e colaboradores utilizaram uma inteligente estratégia para adquirir informações estruturais sobre os antígenos do grupo sanguíneo. Havia sido encontradas enzimas que degradariam os antígenos especificamente. Entretanto, essas enzimas estavam disponíveis apenas como preparações enzimáticas brutas, possivelmente contendo mais de uma enzima com especificidade desconhecida. A degradação dos antígenos do tipo sanguíneo por essas preparações brutas de enzimas podia ser inibida pela adição à reação de moléculas de açúcar específicas. Apenas açúcares encontrados nos antígenos do tipo sanguíneo causariam essa inibição. Uma preparação enzimática, isolada do protozoário *Trichomonas foetus*, degradava todos os três antígenos, sendo inibida

pela adição de açúcares específicos. Os resultados desses estudos estão resumidos na tabela a seguir, mostrando a porcentagem de substrato que permaneceu inalterada quando a enzima de *T. foetus* agiu sobre os antígenos do grupo sanguíneo na presença de açúcares.

Açúcar adicionado	Substrato inalterado (%)		
	Antígeno A	Antígeno B	Antígeno O
Controle – sem açúcar	3	1	1
L-Fucose	3	1	100
D-Fucose	3	1	1
L-Galactose	3	1	3
D-Galactose	6	100	1
N-Acetilglicosamina	3	1	1
N-Acetilgalactosamina	100	6	1

Para o antígeno O, a comparação entre os resultados do controle e da L-fucose mostra que a L-fucose inibe a degradação do antígeno. Esse é um exemplo de inibição pelo produto, na qual um excesso do produto da reação desloca o equilíbrio da reação, impedindo a adicional hidrólise do substrato.

- (f) Embora o antígeno O contenha galactose, N-acetilglicosamina e N-acetilgalactosamina, nenhum desses açúcares inibiu a degradação desse antígeno. Com base nesse resultado, a preparação enzimática obtida de *T. foetus* contém uma endoglicosidase ou uma exoglicosidase? (Endoglicosidases clivam ligações entre resíduos internos; exoglicosidases removem um resíduo de cada vez a partir da extremidade de um polímero.) Explique o raciocínio utilizado.
- (g) A fucose também está presente nos antígenos A e B. Com base na estrutura desses antígenos, por que a fucose não inibiu a degradação desses antígenos pela enzima de *T. foetus*? Qual estrutura seria produzida?
- (h) Quais dos resultados em (f) e (g) são consistentes com as estruturas mostradas na Figura 10-14? Explique o raciocínio utilizado.

Referência

Morgan, W.T.J. 1960. The Croonian Lecture: a contribution to human biochemical genetics; the chemical basis of blood-group specificity. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 151:308–347.

Nucleotídeos e ácidos nucleicos

- 8.1 Alguns dados básicos 279
- 8.2 Estrutura dos ácidos nucleicos 285
- 8.3 Química dos ácidos nucleicos 295
- 8.4 Outras funções dos nucleotídeos 310

Os nucleotídeos têm várias funções no metabolismo celular. Eles são a moeda energética nas transações metabólicas; são as ligações químicas essenciais nas respostas da célula a hormônios e a outros estímulos extracelulares; e são os componentes estruturais de uma estrutura ordenada de cofatores enzimáticos e intermediários metabólicos. E, por último, mas certamente não menos importante, eles são os constituintes dos ácidos nucleicos: **ácido desoxirribonucleico (DNA)** e **ácido ribonucleico (RNA)**, os repositórios moleculares da informação genética. A estrutura de cada proteína, e, em última análise, de cada biomolécula e componente celular, é um produto da informação programada na sequência nucleotídica de ácidos nucleicos da célula (ou vírus). A capacidade de armazenar e transmitir a informação genética de uma geração a outra é uma condição fundamental para a vida.

Este capítulo fornece uma visão geral da natureza química dos nucleotídeos e ácidos nucleicos encontrados na maioria das células; uma abordagem mais detalhada da função dos ácidos nucleicos é o foco da Parte III deste texto.

8.1 Alguns dados básicos

A sequência de aminoácidos de cada proteína em uma célula e a sequência de nucleotídeos de cada RNA são especificadas por uma sequência de nucleotídeos no DNA da célula. Um segmento de uma molécula de DNA que contém a informação necessária para a síntese de um produto biologicamente funcional, seja proteína ou RNA, é denominado **gene**. Uma célula costuma ter muitos milhares de genes, e moléculas de DNA, não surpreendentemente, tendem a ser muito grandes. O armazenamento e a transferência da informação biológica são as únicas funções conhecidas do DNA.

O RNA tem uma ampla variedade de funções e muitas classes são encontradas nas células. Os **RNA ribossômicos (rRNA)** são componentes dos ribossomos, os complexos que executam a síntese proteica. Os **RNA mensageiros (mRNA)** são intermediários, carregando informações para a síntese de uma proteína de um ou mais genes para um ribossomo. Os **RNA transportadores (tRNA)** são moléculas adaptadoras que traduzem fielmente a informação no mRNA em uma sequência específica de aminoácidos. Além dessas classes principais, existem muitos RNA com funções especiais, os quais serão descritos detalhadamente na Parte III.

Nucleotídeos e ácidos nucleicos têm pentoses e bases características

Um **nucleotídeo** tem três componentes característicos: (1) uma base nitrogenada (contendo nitrogênio), (2) uma pentose e (3) um ou mais fosfatos (**Figura 8-1**). A molécula sem o grupo fosfato é denominada **nucleosídeo**. As bases nitrogenadas são derivadas de dois compostos relacionados, a **pirimidina** e a **purina**. As bases e as pentoses dos nucleotídeos comuns são compostos heterocíclicos.

>> Convenção-chave: os átomos de carbono e de nitrogênio nas estruturas relacionadas são numerados convencionalmente para facilitar a denominação e a identificação dos muitos compostos derivados. A convenção para o anel da pentose segue as regras descritas no Capítulo 7, porém, nas pentoses dos nucleotídeos e dos nucleosídeos, os números dos carbonos recebem a designação de um apóstrofo (') para diferenciá-los dos átomos numerados nas bases nitrogenadas. <<

A base de um nucleotídeo é ligada covalentemente (no N-1 das pirimidinas e no N-9 das purinas) por uma ligação *N-β*-glicosídica ao carbono 1' da pentose, e o fosfato é esterificado no carbono 5'. A ligação *N-β*-glicosídica é formada pela remoção dos elementos de água (um grupo hidroxila da pentose e o hidrogênio da base), como na formação da ligação *O*-glicosídica (ver Figura 7-30).

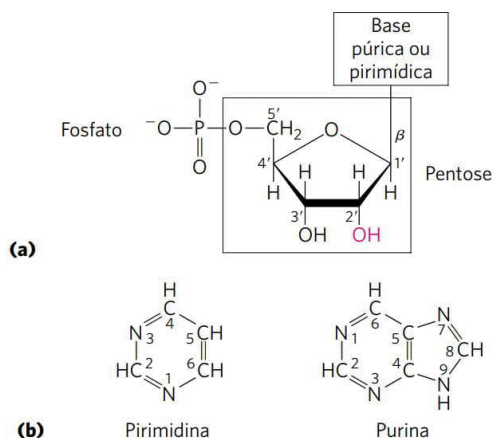


FIGURA 8-1 Estrutura de nucleotídeos. (a) Estrutura geral, mostrando a convenção numérica do anel de pentose. Este é um ribonucleotídeo. Nos desoxirribonucleotídeos, o grupo —OH no carbono 2 (em vermelho) é substituído por —H . (b) Compostos ancestrais das bases pirimídicas e púricas dos nucleotídeos e dos ácidos nucleicos, mostrando a convenção numérica.

Tanto o DNA quanto o RNA contêm duas bases púricas principais, **adenina** (A) e **guanina** (G), e duas pirimídicas. No DNA e no RNA, uma das pirimidinas é a **citossina** (C), porém a outra não é a mesma nos dois: é a **timina** (T), no DNA, e a **uracila** (U), no RNA. Raramente a timina é encontrada no RNA ou a uracila no DNA. As estruturas das cinco principais bases estão mostradas na **Figura 8-2**, e a nomenclatura de seus nucleotídeos e nucleosídeos correspondentes está resumida na Tabela 8-1.

Os ácidos nucleicos têm dois tipos de pentoses. As recorrentes unidades desoxirribonucleotídicas do DNA contêm 2-desóxi-D-ribose, e as unidades ribonucleotídicas do RNA, D-ribose. Nos nucleotídeos, ambos os tipos de pentoses estão na forma β -furanose (anel fechado com cinco

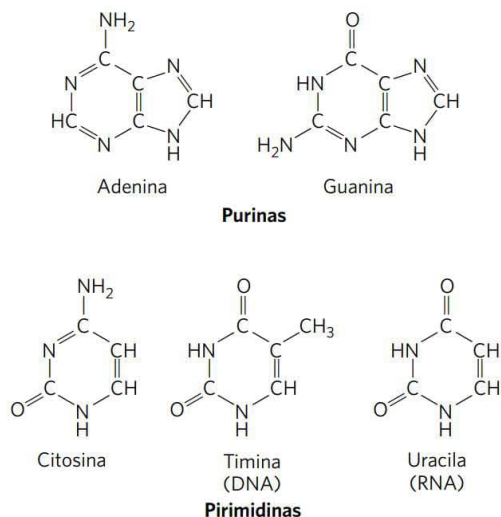


FIGURA 8-2 Principais bases púricas e pirimídicas dos ácidos nucleicos. Alguns dos nomes comuns dessas bases refletem as circunstâncias das suas descobertas. A guanina, por exemplo, foi primeiramente isolada de guano (esterco de pássaro), ao passo que a timina foi isolada originariamente de tecido do timo.

átomos). Como mostra a **Figura 8-3**, o anel de pentose não é planar, mas ocorre em uma série de conformações geralmente descritas como “pregueadas”.

>> Convenção-chave: embora o DNA e o RNA pareçam ter duas características distintas – pentoses diferentes e a presença de uracila no RNA e de timina no DNA –, são as pentoses que definem a identidade de um ácido nucleico. Se o ácido nucleico contém 2'-desóxi-D-ribose, é DNA por definição, mesmo que contenha uracila. Da mesma forma, se o ácido nucleico contém D-ribose, é RNA, independentemente da sua composição de base. ◀◀

TABELA 8-1 Nomenclatura de nucleotídeo e de ácido nucleico

Base	Nucleosídeo	Nucleotídeo	Ácido nucleico
Purinas			
Adenina	Adenosina	Adenilil	RNA
	Desoxiadenosina	Desoxiadenilato	DNA
Guanina	Guanosina	Guanilato	RNA
	Desoxiguanosina	Desoxiguanilato	DNA
Pirimidinas			
Citosina	Citidina	Citidilato	RNA
	Desoxicitidina	Desoxicitidilato	DNA
Timina	Timidina ou desoxitimidina	Timidilato ou desoxitimidilato	DNA
Uracila	Uridina	Uridilato	RNA

Nota: “Nucleosídeo” e “nucleotídeo” são termos genéricos que incluem ambas as formas ribo ou desoxirribo. Além disso, ribonucleosídeos e ribonucleotídeos são aqui designados simplesmente como nucleosídeos e nucleotídeos (p. ex., riboadenosina como adenosina), e desoxirribonucleosídeos e desoxirribonucleotídeos como desoxinucleosídeos e desoxinucleotídeos (p. ex., desoxirriboadenosina como desoxiadenosina). Ambas as formas de denominação são aceitas, porém os nomes mais curtos são mais comumente usados. A timina é uma exceção; “ribotimidina” é usado para descrever sua ocorrência incomum no RNA.

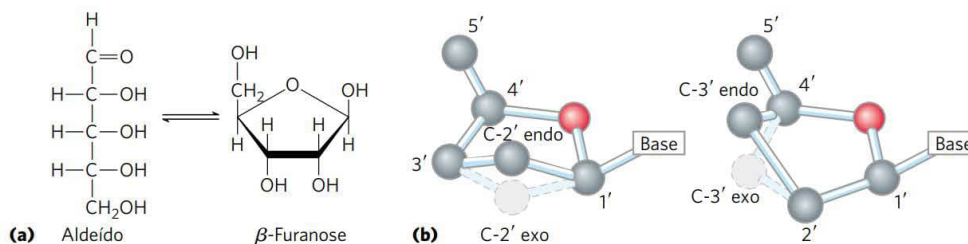


FIGURA 8-3 Conformação da ribose. (a) Em solução, as formas de cadeia reta (aldeído) e em anel (β -furanose) da ribose livre estão em equilíbrio. O RNA contém apenas a forma em anel, a β -D-ribofuranose. A desoxirribose sofre uma interconversão semelhante em solução, porém, no DNA, existe apenas a β -2'-desóxi-D-ribofuranose. (b) Os anéis de ribofuranose nos nucleotídeos podem existir em quatro diferentes conformações pregueadas. Em todos os casos, quatro dos cinco átomos estão em uma forma planar. O quinto átomo (C-2' ou C-3') está no mesmo lado (endo) ou no lado oposto (exo) do plano em relação ao átomo de C-5'.

A **Figura 8-4** mostra as estruturas e os nomes dos quatro principais **desoxirribonucleotídeos** (desoxirribonucleosídeo-5'-monofosfato; às vezes, chamado de desoxinucleotídeo

e desoxinucleosídeo trifostato), as unidades estruturais dos DNA, e os quatro principais **ribonucleotídeos** (ribonucleosídeo-5'-monofosfato), as unidades estruturais dos RNA.

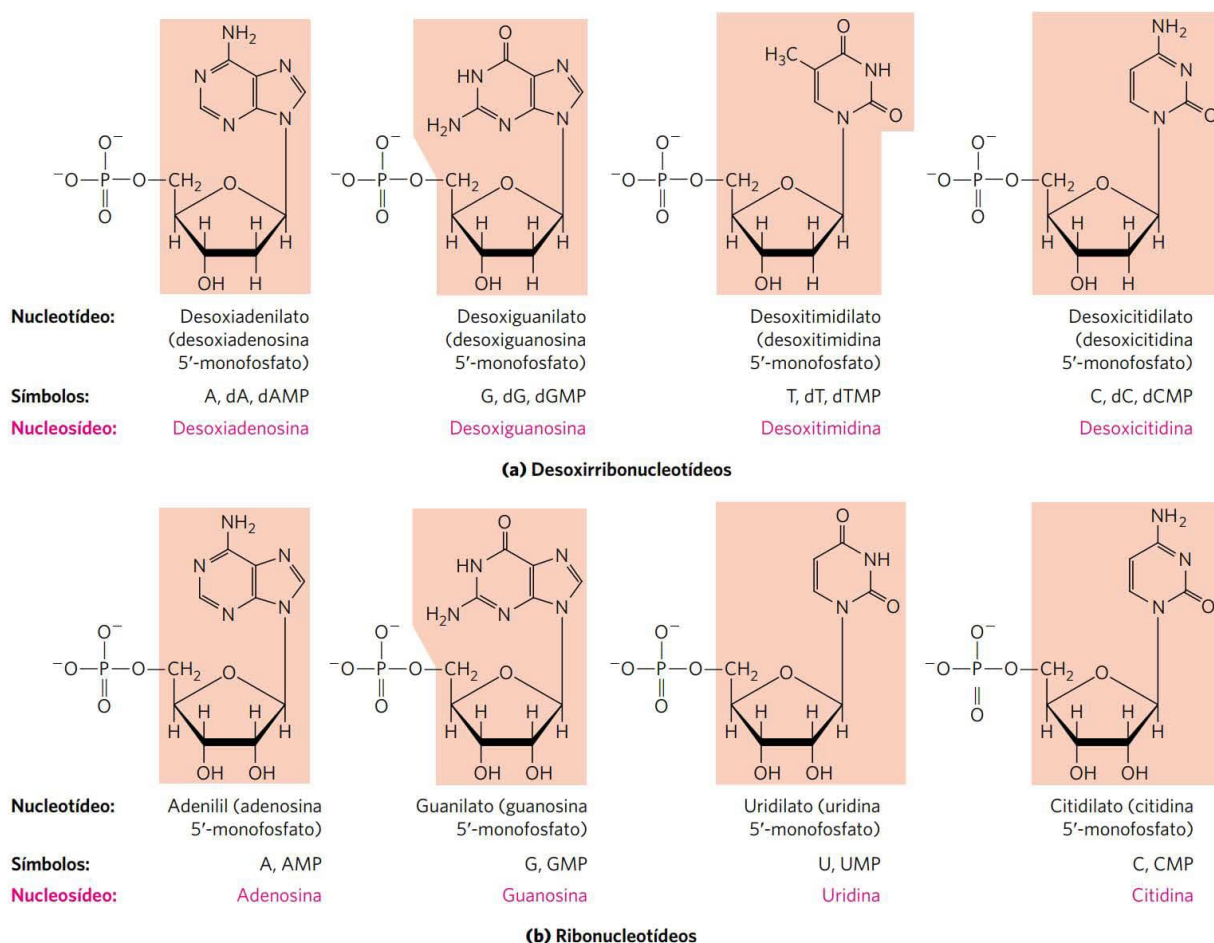


FIGURA 8-4 Desoxirribonucleotídeos e ribonucleotídeos dos ácidos nucleicos. Todos os nucleotídeos estão mostrados nas suas formas livres em pH 7,0. As unidades nucleotídicas do DNA **(a)** são, em geral, simbolizadas como A, G, T e C e, algumas vezes, como dA, dG, dT e dC; aquelas do RNA **(b)** como A, G, U e C. Na sua forma livre, os desoxirribonucleotídeos são comumente abreviados como dAMP, dGMP, dTMP e dCMP; os ribonucleotídeos, AMP, GMP, TMP e CMP. Para cada nucleotídeo, os nomes comuns são seguidos pelo nome completo entre parênteses. Todas as abreviaturas assumem que o grupamento fosfato está na posição 5'. A porção nucleosídica de cada molécula está sombreada em cor salmão. Nesta e nas próximas ilustrações, os carbonos do anel não estão mostrados.

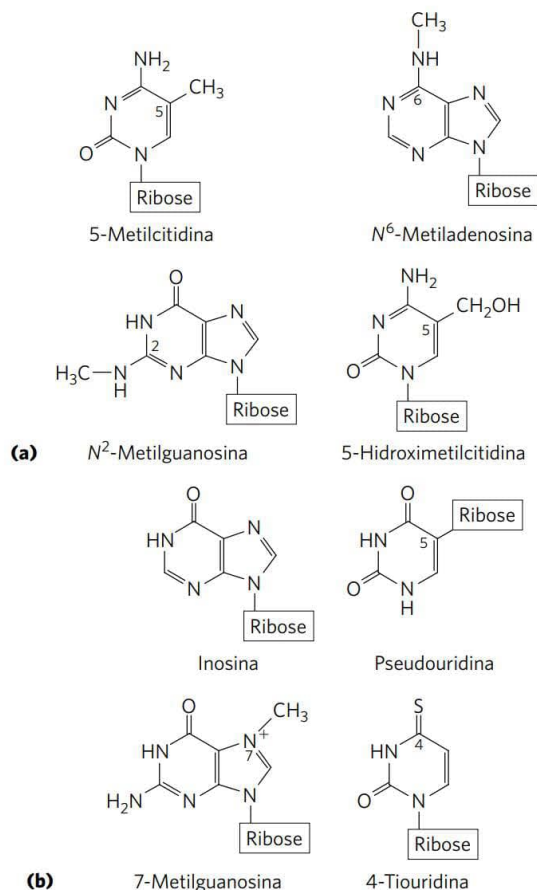


FIGURA 8-5 Algumas bases púricas e pirimídicas secundárias, mostradas como nucleosídeos. (a) Bases secundárias do DNA. A 5-metilcitidina ocorre no DNA de animais e de plantas superiores, a N^6 -metiladenosina, no DNA bacteriano, e a 5-hidroximetilcitidina, no DNA de animais e bactérias infectados por determinados bacteriófagos. **(b)** Algumas bases secundárias do tRNA. A inosina contém a base hipoxantina. Observe que a pseudouridina, como a uridina, contém uracila; elas são diferentes no ponto de ligação à ribose – na uridina, a uracila é ligada pelo N-1, o ponto de ligação comum para pirimidinas; na pseudouridina, pelo C-5.

Embora os nucleotídeos que contêm as principais purinas e pirimidinas sejam os mais comuns, o DNA e o RNA também contêm algumas bases secundárias (**Figura 8-5**). No DNA, as mais comuns delas são as formas metiladas das bases principais; em alguns DNA virais, algumas bases podem ser hidroximetiladas ou glicosiladas. As bases alteradas ou raras na molécula de DNA muitas vezes apresentam funções na regulação ou na proteção da informação genética. Bases secundárias de muitos tipos também são encontradas nos RNA, sobretudo nos tRNA (ver Figuras 8-25 e 26-22).

>> Convenção-chave: a nomenclatura para as bases secundárias pode ser confusa. Assim como as bases principais, muitas têm nomes comuns – hipoxantina, por exemplo, mostrada como seu nucleosídeo inosina na Figura 8-5. Quando um átomo no anel púrico ou pirimídico é substituído, a convenção usual (utilizada aqui) serve simplesmente para indicar a

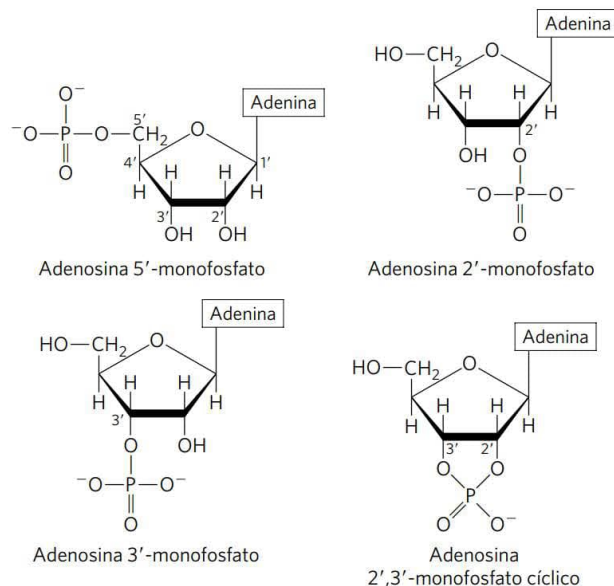


FIGURA 8-6 Alguns monofosfatos de adenosina. Adenosina 2'-monofosfato, adenosina 3'-monofosfato e adenosina 2',3'-monofosfato cíclico são formados por hidrólise enzimática e alcalina do RNA.

posição no anel do átomo substituído pelo seu número – por exemplo, 5-metilcitosina, 7-metilguanina e 5-hidroximetilcitosina (mostrados como nucleosídeos na Figura 8-5). O elemento ao qual o átomo substituído está ligado (N, C, O) não é identificado. A convenção muda quando o átomo substituído é exocíclico (não se encontra dentro da estrutura cíclica); nesse caso, o tipo de átomo é identificado, e a posição no anel ao qual ele está ligado é indicada por sobrescrito. O nitrogênio amina ligado ao C-6 da adenina é N^6 ; da mesma forma, o oxigênio da carbonila e o nitrogênio amina no C-6 e no C-2 da guanina são O^6 e N^2 , respectivamente. Exemplos dessa nomenclatura são N^6 -metiladenosina e N^2 -metilguanina (Figura 8-5). <<

As células também contêm nucleotídeos com grupos fosfato em posições diferentes do carbono 5' (**Figura 8-6**). Os **ribonucleosídeos 2',3'-monofosfatos cíclicos** são intermediários isoláveis, e os **ribonucleosídeos 3'-monofosfatos** são produtos de hidrólise do RNA por determinadas ribonucleases. Outras variações são adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP) e guanina 3',5'-monofosfato cíclico (cGMP), considerados no final deste capítulo.

As ligações fosfodiéster ligam nucleotídeos consecutivos nos ácidos nucleicos

Os nucleotídeos consecutivos de DNA e RNA são ligados covalentemente por “pontes” de grupos fosfato, nas quais o grupo 5'-fosfato de uma unidade nucleotídica é ligado ao grupo 3'-hidroxila do próximo nucleotídeo, criando uma **ligação fosfodiéster** (**Figura 8-7**). Portanto, o esqueleto covalente dos ácidos nucleicos consiste em fosfatos e resíduos de pentose alternados, e as bases nitrogenadas podem ser consideradas como grupos laterais ligados ao esqueleto

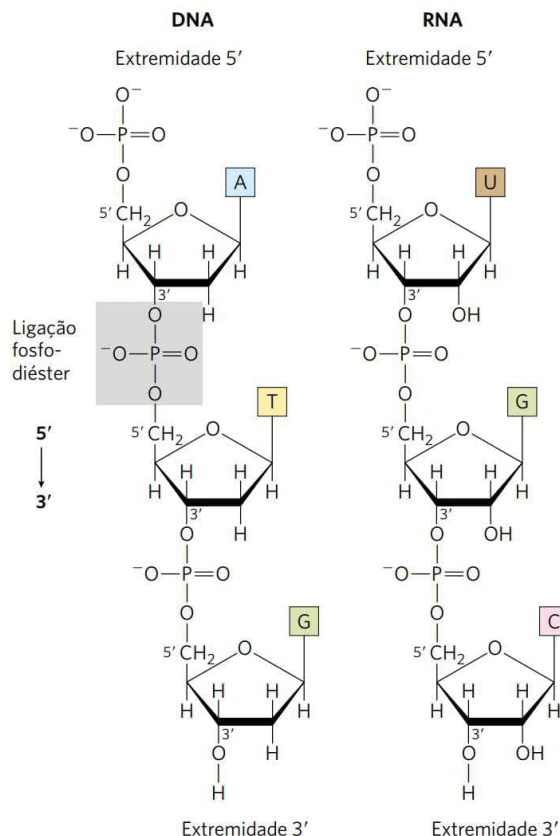


FIGURA 8-7 Ligações fosfodiéster no esqueleto covalente do DNA e do RNA. As ligações fosfodiéster (uma das quais está sombreada no DNA) ligam unidades nucleotídicas sucessivas. O esqueleto de pentose e de grupos fosfato alternados nos dois tipos de ácidos nucleicos é altamente polar. As extremidades 5' e 3' da macromolécula podem estar livres ou ligadas a um grupo fosforila.

em intervalos regulares. Os esqueletos do DNA e do RNA são hidrofílicos. Os grupos hidroxila dos resíduos de açúcar formam ligações de hidrogênio com a água. Os grupos fosfato, com um pK_a próximo a 0, são completamente ionizados e carregados negativamente em pH 7, e as cargas negativas são, de modo geral, neutralizadas pelas interações iônicas com cargas positivas de proteínas, de íons metálicos e de poliaminas.

>> Convenção-chave: todas as ligações fosfodiéster no DNA e no RNA têm a mesma orientação ao longo da cadeia (Figura 8-7), conferindo a cada fita do ácido nucleico uma polaridade específica e extremidades 5' e 3' diferentes. Por definição, a **extremidade 5'** não apresenta um nucleotídeo na posição 5', e a **extremidade 3'** não apresenta um nucleotídeo na posição 3'. Outros grupos (com frequência um ou mais fosfatos) podem estar presentes em uma ou em ambas as extremidades. A orientação 5'→3' de uma fita do ácido nucleico se refere a uma *extremidade* da fita e à orientação de nucleotídeos individuais, não à orientação de ligações fosfodiéster individuais ligando seus nucleotídeos constituintes. <<

O esqueleto covalente do DNA e do RNA está sujeito à hidrólise lenta e não enzimática das ligações fosfodiéster. No tubo de ensaio, o RNA é hidrolisado rapidamente em condições alcalinas, mas não o DNA; os grupamentos 2'-hidroxila no RNA (ausentes no DNA) estão diretamente envolvidos nesse processo. Os nucleotídeos 2',3'-monofosfato cíclicos são os primeiros produtos da ação de álcalis sobre o RNA e são rapidamente hidrolisados para gerar uma mistura de 2' e 3'-nucleosídeos monofosfato (Figura 8-8).

As sequências nucleotídicas dos ácidos nucleicos podem ser representadas esquematicamente, como ilustrado a seguir, por um segmento de DNA com cinco unidades nucleotídicas. Os grupos fosfato são simbolizados pelo P , e cada desoxirribose é simbolizada por uma linha vertical, a partir

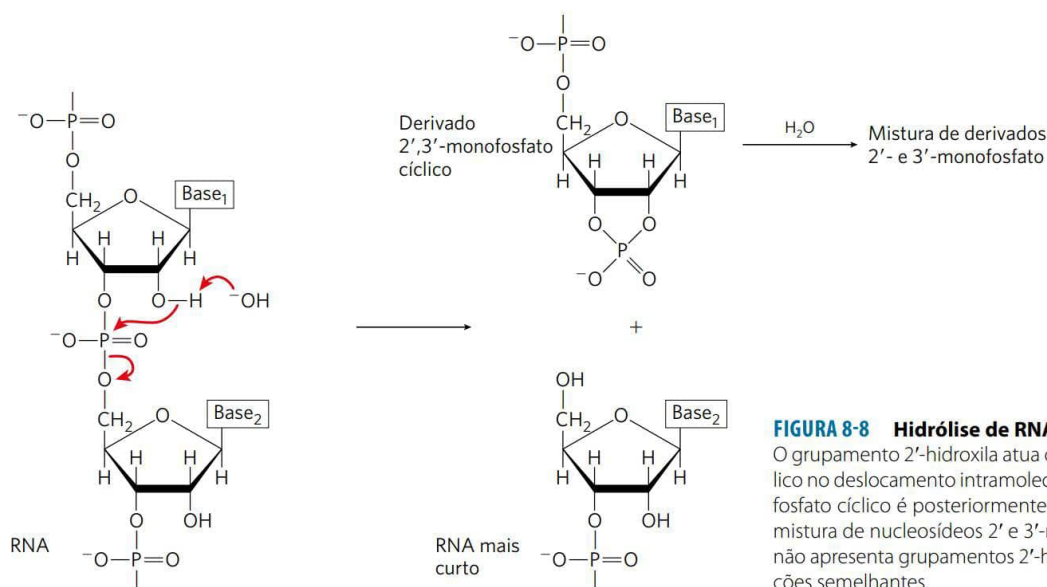
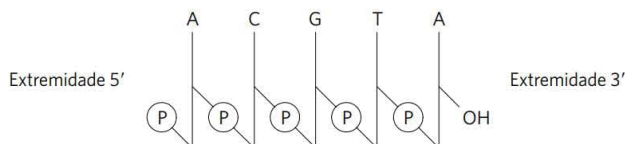


FIGURA 8-8 Hidrólise de RNA em condições alcalinas. O grupamento 2'-hidroxila atua como grupamento nucleofílico no deslocamento intramolecular. O derivado 2',3'-monofosfato cíclico é posteriormente hidrolisado para gerar uma mistura de nucleosídeos 2' e 3'-monofosfato. O DNA, o qual não apresenta grupamentos 2'-hidroxila, é estável em condições semelhantes.

do C-1' na parte superior para o C-5' na parte inferior (mas lembre-se de que, nos ácidos nucleicos, o açúcar está sempre na sua forma de anel fechado de β' furanose). As linhas de conexão entre os nucleotídeos (as quais passam pelo P) estão desenhadas diagonalmente a partir do centro (C-3') da desoxirribose de um nucleotídeo para a parte inferior (C-5') do próximo nucleotídeo.



Algumas representações mais simples desse pentadesoxirribonucleotídeo são pA-C-G-T-A_{OH}, pApCpGpTpA e pACGTA.

>> Convenção-chave: a sequência de um único segmento de ácido nucleico é sempre escrita com a extremidade 5' à esquerda e a extremidade 3' à direita, ou seja, na direção 5'→3'. <<

Um ácido nucleico pequeno é denominado **oligonucleotídeo**. A definição de “pequeno” é um tanto arbitrária, mas polímeros contendo 50 nucleotídeos ou menos, em geral, são chamados de oligonucleotídeos. Um ácido nucleico maior é chamado de **polinucleotídeo**.

As propriedades das bases nucleotídicas afetam a estrutura tridimensional dos ácidos nucleicos

Purinas e pirimidinas livres são compostos fracamente básicos e, por isso, são chamados de bases. As purinas e as pirimidinas comuns no DNA e no RNA são moléculas aromáticas (Figura 8-2), uma propriedade com consequências importantes para a estrutura, a distribuição dos elétrons e a absorção de luz dos ácidos nucleicos. O deslocamento de elétrons entre os átomos no anel confere à maioria das ligações no anel caráter de ligação dupla parcial. O resultado é que as pirimidinas são moléculas planares, e as purinas são muito próximas a uma estrutura planar, com uma leve preguia. Bases púricas e pirimídicas livres podem existir em duas ou mais formas tautoméricas, dependendo do pH. A uracila, por exemplo, ocorre nas formas lactâmicas, lactínicas e lactínicas duplas (Figura 8-9). As estruturas mostradas na Figura 8-2 são os tautômeros que predominam em pH 7,0.

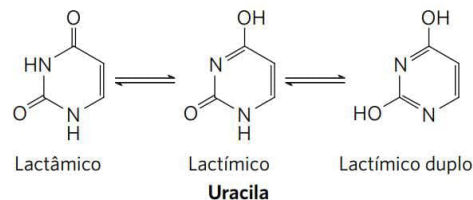


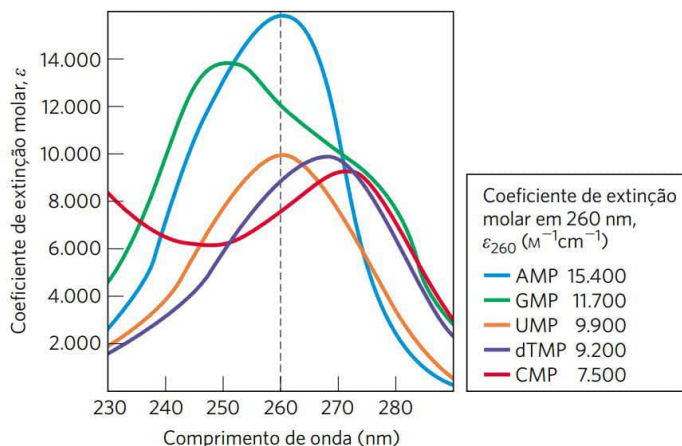
FIGURA 8-9 Formas tautoméricas da uracila. A forma lactâmica predomina em pH 7,0; as outras formas tornam-se mais proeminentes quando o pH diminui. As outras pirimidinas e as purinas livres também têm formas tautoméricas, mas são raramente encontradas.

Todas as bases nucleotídicas absorvem luz UV, e os ácidos nucleicos são caracterizados por uma forte absorção em comprimentos de onda próximos a 260 nm (Figura 8-10).

As bases púricas e pirimídicas são hidrofóbicas e relativamente insolúveis em água próximo ao pH neutro da célula. Em pH ácido ou alcalino, as bases tornam-se carregadas, e sua solubilidade em água aumenta. Interações de empilhamento hidrofóbicas, em que duas ou mais bases são posicionadas com os planos de seus anéis em paralelo (como pilha de moedas), são uma das duas formas mais importantes de interação entre bases nos ácidos nucleicos. O empilhamento também envolve a combinação de interações dipolo-dipolo e interações de van der Waals entre as bases. O empilhamento de bases ajuda a minimizar o contato das bases com a água, e interações de empilhamento de bases são muito importantes na estabilização da estrutura tridimensional dos ácidos nucleicos, como descrito posteriormente.

Os grupos funcionais das purinas e das pirimidinas são anéis nitrogenados, grupos carbonila e grupos amina exocíclicos. As ligações de hidrogênio envolvendo os grupos amina e carbonila são a forma mais importante de interação entre duas (e, ocasionalmente, três ou quatro) cadeias complementares de ácidos nucleicos. Os padrões mais comuns de ligações de hidrogênio são aqueles definidos por James D. Watson e Francis Crick em 1953, nos quais A se liga especificamente a T (ou U) e G se liga a C (Figura 8-11). Esses dois tipos de **pares de bases** predominam no DNA de dupla-fita e no RNA, e os tautômeros mostrados na Figura 8-2 são responsáveis por esses padrões. É esse pareamento específico de bases que

FIGURA 8-10 Espectro de absorção dos nucleotídeos comuns. Os espectros estão mostrados de acordo com a variação nos coeficientes de extinção molar pelo comprimento de onda. Os coeficientes de extinção molar em 260 nm e pH 7,0 (ϵ_{260}) estão listados na tabela. Os espectros dos ribonucleotídeos e desoxirribonucleotídeos correspondentes, assim como os nucleosídeos, são essencialmente idênticos. Para misturas de nucleotídeos, o comprimento de onda de 260 nm (linha vertical tracejada) é usado para medidas de absorção.



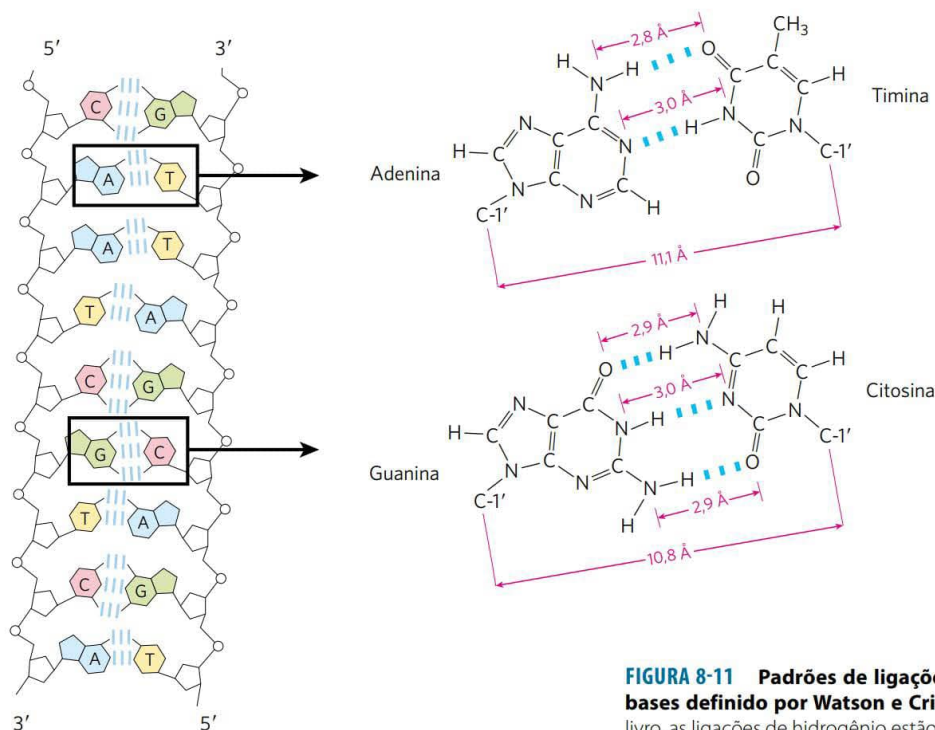


FIGURA 8-11 Padrões de ligações de hidrogênio no pareamento de bases definido por Watson e Crick. Aqui, como em outras partes deste livro, as ligações de hidrogênio estão representadas por três linhas azuis.



James D. Watson
[Fonte: UPI/Bettmann/
Corbis.]



Francis Crick, 1916-2004
[Fonte: UPI/Bettmann/
Corbis.]

permite a duplicação da informação genética, como será discutido posteriormente neste capítulo.

RESUMO 8.1 Alguns dados básicos

- Um nucleotídeo é constituído por uma base nitrogenada (purina ou pirimidina), um açúcar pentose e um ou mais grupos fosfato. Os ácidos nucleicos são polímeros de nucleotídeos, unidos por ligações fosfodiéster entre o grupo 5'-hidroxila de uma pentose e o grupo 3'-hidroxila da próxima pentose.
- Existem dois tipos de ácidos nucleicos: RNA e DNA. Os nucleotídeos no RNA contêm ribose, e as bases pirimídicas comuns são a uracila e a citosina. No DNA, os nucleotídeos contêm 2'-desoxirribose, e as bases pirimídicas comuns são a timina e a citosina. As purinas primárias são a adenina e a guanina tanto no RNA quanto no DNA.

8.2 Estrutura dos ácidos nucleicos

A descoberta da estrutura do DNA por Watson e Crick, em 1953, deu origem a disciplinas completamente novas e influenciou o rumo de muitas já estabelecidas. Nesta seção, o foco principal será a estrutura do DNA, alguns dos eventos que conduziram para a sua descoberta e aprimoramentos mais recentes na nossa compreensão do DNA. A estrutura do RNA também será apresentada.

Como no caso da estrutura proteica (Capítulo 4), muitas vezes é útil descrever a estrutura de ácidos nucleicos em termos de níveis de complexidade hierárquicos (primário, secundário, terciário). A estrutura primária dos ácidos nucleicos é sua estrutura covalente e sua sequência nucleotídica. Qualquer estrutura regular e estável adotada por alguns ou todos os nucleotídeos em um ácido nucleico pode ser considerada como estrutura secundária. Todas as estruturas consideradas no restante deste capítulo se classificam como estruturas secundárias. O enovelamento complexo de grandes cromossomos dentro da cromatina eucariótica e o nucleóide bacteriano ou o elaborado enovelamento de grandes moléculas de tRNA ou rRNA são, em geral, considerados estruturas terciárias. A estrutura terciária do DNA é discutida no Capítulo 24. A estrutura terciária do RNA é considerada superficialmente neste capítulo e mais profundamente no Capítulo 26.

O DNA é uma dupla-hélice que armazena informação genética

O DNA foi inicialmente isolado e caracterizado por Friedrich Miescher em 1868. Ele chamou a substância contendo fósforo de “nucleína”. Até 1940, com o trabalho de Oswald T. Avery, Colin MacLeod e Maclyn McCarty, não existia uma

evidência convincente de que o DNA fosse o material genético. Avery e colaboradores descobriram que um extrato de uma cepa virulenta da bactéria *Streptococcus pneumoniae* (causadora de doença em camundongos) poderia ser usado para transformar uma cepa não virulenta da mesma bactéria em uma cepa virulenta. Eles foram capazes de demonstrar, por meio de vários testes químicos, que era o DNA da cepa virulenta (p. ex., não proteína, polissacarídeo ou RNA) que transportava a informação genética para a virulência. Então, em 1952, experimentos de Alfred D. Hershey e Martha Chase, que estudaram a infecção de células bacterianas por um vírus (bacteriófago), com DNA ou proteína marcados radioativamente, acabaram com qualquer dúvida remanescente de que o DNA, e não a proteína, portava a informação genética.

Outra pista importante para a estrutura do DNA veio do trabalho de Erwin Chargaff e colaboradores no fim de 1940. Eles descobriram que as quatro bases nucleotídicas do DNA eram encontradas em proporções diferentes nos DNA de organismos diferentes e que as quantidades de certas bases estavam relacionadas. Esses dados, coletados a partir de DNA de uma variedade muito grande de espécies, conduziram Chargaff às seguintes conclusões:

1. A composição de bases do DNA, em geral, varia de uma espécie para a outra.
2. Amostras de DNA isoladas de diferentes tecidos da mesma espécie têm a mesma composição de bases.
3. A composição de bases de DNA em uma dada espécie não muda com a idade do organismo, seu estado nutricional ou a mudança de ambiente.
4. Em todos os DNA celulares, independentemente da espécie, o número de resíduos da adenosina é igual ao número de resíduos da timidina (i.e., $A = T$) e o número de resíduos de guanosina é igual ao número de resíduos de citidina ($G = C$). Dessas correlações, conclui-se que a soma dos resíduos de purina é igual à soma dos resíduos de pirimidina; isto é, $A + G = T + C$.

Essas relações quantitativas, algumas vezes denominadas “regras de Chargaff”, foram confirmadas por muitos outros pesquisadores. Elas foram a chave para estabelecer a estrutura tridimensional do DNA e para levantar pistas da forma como a informação genética está codificada no DNA e é transmitida de uma geração para a outra.

Para esclarecer melhor sobre a estrutura do DNA, Rosalind Franklin e Maurice Wilkins usaram o método poderoso de difração de raios X (ver Quadro 4-5) para analisar as fibras de DNA no início da década de 50. Embora faltando a definição molecular de difração de cristais, o padrão de difração de raios X gerado a partir das fibras foi informativo (**Figura 8-12**). O padrão revelou que as moléculas de DNA são helicoidais, com duas periodicidades ao longo de seu longo eixo, uma primária de $3,4 \text{ \AA}$ e uma secundária de 34 \AA . O problema, então, era propor o modelo tridimensional de uma molécula de DNA que pudesse ser compatível não apenas com os dados de difração de raios X, mas também com a equivalência específica de bases $A = T$ e $G = C$ descoberta por Chargaff e com as outras propriedades químicas do DNA.

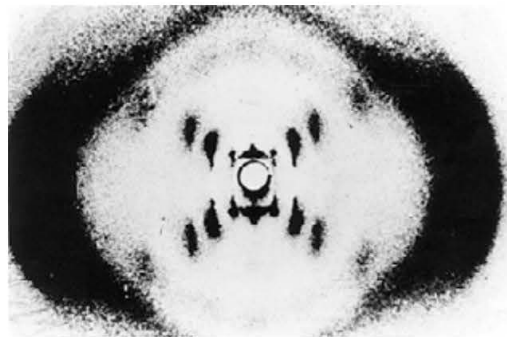


FIGURA 8-12 Padrão de difração de raios X de fibras do DNA. As marcas formando uma cruz no centro demonstram a estrutura helicoidal. As bandas pesadas à esquerda e à direita originam-se das bases recorrentes. [Fonte: Science Source.]

James Watson e Francis Crick contaram com essas informações acumuladas sobre o DNA para deduzir sua estrutura. Em 1953, eles postularam o modelo tridimensional da estrutura do DNA que levava em consideração todos os dados disponíveis. O modelo consiste em duas cadeias de DNA helicoidais enroladas em torno do mesmo eixo para formar uma dupla-hélice de orientação à direita (ver no Quadro 4-1 uma explicação sobre a orientação à direita e à esquerda da estrutura helicoidal). Os esqueletos hidrofílicos de grupos fosfato e desoxirribose alternados estão no lado de fora da dupla-hélice, orientados para a água circundante. O anel furanósido de cada desoxirribose está na conformação C-2' endo. As bases pirimídicas e púricas das duas fitas estão empilhadas dentro da dupla-hélice, com suas estruturas hidrofóbicas em forma de anel e quase planares muito perto uma da outra e perpendiculares ao eixo longitudinal. O pareamento perfeito das duas fitas cria um **sulco maior** e um **sulco menor** na superfície do duplex (**Figura 8-13**). Cada base nucleotídica de uma fita está pareada no mesmo plano com a base da outra fita. Watson e Crick descobriram que os pares de bases unidos por ligações de hidrogênio ilustrados na Figura 8-11, G com C e A com T, são aqueles que se encaixam melhor dentro da estrutura, fornecendo uma justificativa para a regra de Chargaff de que em qualquer DNA, $G = C$ e $A = T$. É importante observar que três ligações de hidrogênio podem se formar entre G e C, simbolizadas por



Rosalind Franklin, 1920-1958
[Fonte: Science Source.]



Maurice Wilkins, 1916-2004
[Fonte: UPI/Bettmann/Corbis.]

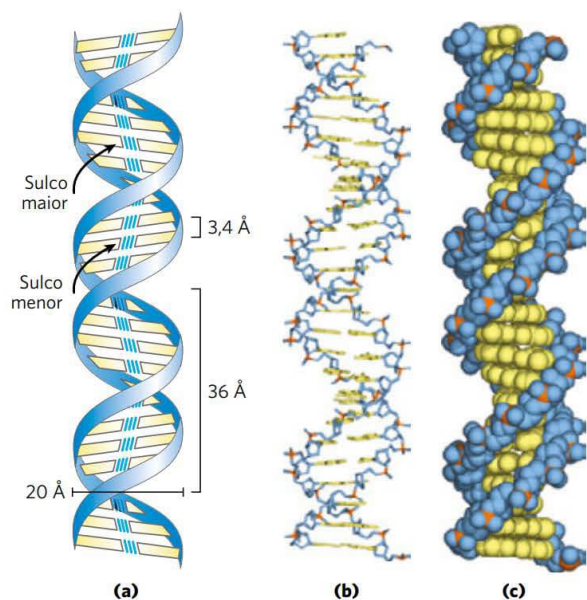


FIGURA 8-13 Modelo de Watson-Crick para a estrutura do DNA.

O modelo original proposto por Watson e Crick tinha 10 pares de bases ou 34 Å (3,4 nm) por volta da hélice; medidas subsequentes revelaram 10,5 pares de bases ou 36 Å (3,6 nm) por volta. **(a)** Representação esquemática, mostrando as dimensões da hélice. **(b)** Representação em bastão, mostrando o esqueleto e o empilhamento de bases. **(c)** Modelo de volume atômico.

$G \equiv C$, mas somente duas podem se formar entre A e T, simbolizadas por $A = T$. Pareamentos diferentes de G com C e de A com T tendem (em graus variados) a desestabilizar a estrutura helicoidal dupla.

Quando Watson e Crick construíram seu modelo, eles tiveram de decidir inicialmente se as fitas de DNA seriam **paralelas** ou **antiparalelas** – se suas ligações fosfodiéster 3',5' seguiriam no mesmo sentido ou em sentidos opostos. Uma orientação antiparalela produziu o modelo mais convincente, e trabalhos posteriores com DNA-polimerases (Capítulo 25) produziram evidências experimentais de que as fitas eram mesmo antiparalelas, um achado confirmado posteriormente por análise de raios X.

Para explicar a periodicidade nos padrões de difração de raios X das fibras de DNA, Watson e Crick manipularam modelos moleculares para chegar à estrutura em que a distância entre as bases empilhadas verticalmente no interior da dupla-hélice seria de 3,4 Å; uma distância de repetição secundária de aproximadamente 34 Å foi atribuída para a presença de 10 pares de bases em cada volta completa da dupla-hélice. Em solução aquosa, a estrutura é um pouco diferente daquela nas fibras, com 10,5 pares de bases por volta helicoidal (Figura 8-13).

Como mostra a **Figura 8-14**, as duas cadeias polinucleotídicas antiparalelas da dupla-hélice de DNA não são idênticas nem na sua sequência de bases, nem na sua composição. Elas são **complementares** entre si. Sempre que a adenina está presente em uma cadeia, a timina é encontrada na outra; da mesma forma, sempre que a guanina está presente em uma cadeia, a citosina é encontrada na outra.

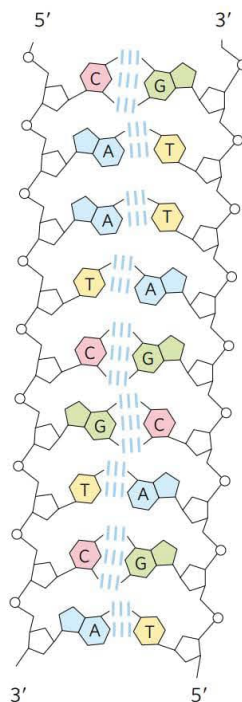


FIGURA 8-14 Complementaridade das cadeias na dupla-hélice de DNA.

As cadeias antiparalelas complementares do DNA seguem as regras propostas por Watson e Crick. As cadeias antiparalelas por pares de bases são diferentes na sua composição de base: a cadeia à esquerda tem a composição $A_3T_2G_1C_3$; a da direita, $A_2T_3G_3C_1$. Elas também se diferenciam na sequência quando cada cadeia é lida na direção 5'→3'. Observe as equivalências de bases: $A = T$ e $G = C$ no duplex.

A dupla-hélice do DNA, ou duplex, é mantida unida por ligações de hidrogênio entre pares de bases complementares (Figura 8-11) e por interações de empilhamento de bases. A complementaridade entre as cadeias de DNA é atribuída à ligação de hidrogênio entre os pares de bases; no entanto, as ligações de hidrogênio não contribuem significativamente para a estabilidade da estrutura. A dupla-hélice é estabilizada primariamente por cátions metálicos, que protegem as cargas negativas dos fosfatos, e por interações de empilhamento de bases entre pares de bases complementares. As interações de empilhamento de bases entre pares adjacentes de $G \equiv C$ são mais fortes do que aquelas entre pares adjacentes $A = T$ ou pares adjacentes incluindo todas as quatro bases. Dessa forma, os duplexes de DNA com maior conteúdo de $G \equiv C$ são mais estáveis.

Os aspectos importantes do modelo da dupla-hélice da estrutura do DNA são mantidos, em grande parte, por evidências biológicas e químicas. Além disso, o modelo sugere imediatamente um mecanismo para a transmissão da informação genética. O aspecto principal do modelo é a complementaridade das duas cadeias de DNA. Como Watson e Crick foram capazes de visualizar, muito antes da disponibilidade de dados confirmatórios, essa estrutura poderia ser replicada de forma lógica pela (1) separação das duas cadeias e pela (2) síntese de uma cadeia complementar a cada uma delas. Uma vez que, em cada nova cadeia, os nucleotídeos são unidos na sequência especificada pelas regras de pareamento de bases descritas anteriormente, cada cadeia preexistente funciona como molde para direcionar a síntese de uma cadeia complementar (**Figura 8-15**). Essas suposições foram confirmadas experimentalmente, inaugurando uma revolução da nossa compreensão da hereditariedade biológica.

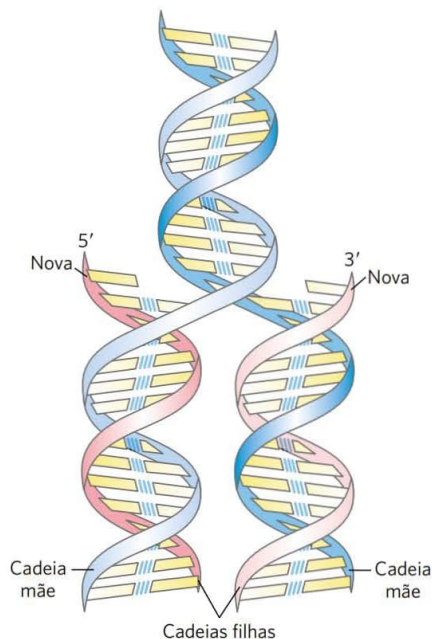


FIGURA 8-15 Replicação do DNA como sugerido por Watson e Crick. As cadeias preexistentes ou “cadeias-mãe” são separadas, e cada uma é o molde para a biossíntese de uma “cadeia-filha” complementar (em cor-de-rosa).

O DNA pode ocorrer em formas tridimensionais diferentes

O DNA é uma molécula extremamente flexível. Uma rotação considerável é possível em torno de vários tipos de ligações no esqueleto açúcar-fosfato (fosfodesoxirribose), e flutuação térmica pode produzir enovelamento, alongamento e desnaturação (fusão) das cadeias. Muitas variações significativas da estrutura de DNA de Watson e Crick são encontradas no DNA celular, algumas ou todas elas podem ser importantes no metabolismo de DNA. Essas variações estruturais geralmente não afetam as propriedades-chave do DNA definidas por Watson e Crick: complementaridade da cadeia, cadeias antiparalelas e a exigência do pareamento $A=T$ e $G=C$.

A variação estrutural no DNA reflete três aspectos: as diferentes conformações possíveis da desoxirribose, a rotação em torno das ligações contíguas que constituem o esqueleto de fosfodesoxirribose (**Figura 8-16a**) e a rotação livre em torno da ligação C-1'-N-glicosídica (**Figura 8-16b**). Devido a restrições estéricas, as purinas nos nucleotídeos púricos estão restritas a duas conformações estáveis com respeito à desoxirribose, denominadas *syn* e *anti* (**Figura 8-16b**). As pirimidinas geralmente estão restritas à conformação *anti*, devido a interferências estéricas entre o açúcar e o oxigênio da carbonila no C-2 da pirimidina.

A estrutura de Watson e Crick também é conhecida como **forma B do DNA** ou B-DNA. A forma B é a estrutura mais estável para uma molécula de DNA de sequência aleatória sob condições fisiológicas, sendo, dessa forma, o ponto de referência padrão em qualquer estudo das propriedades

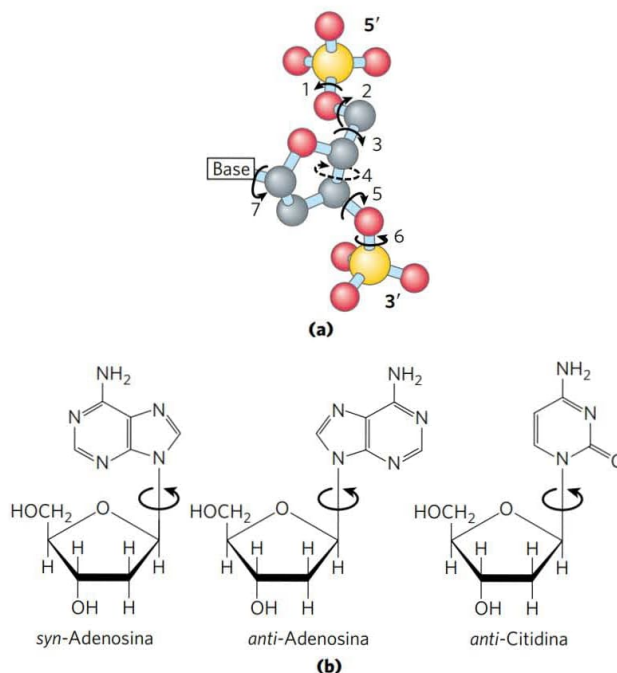
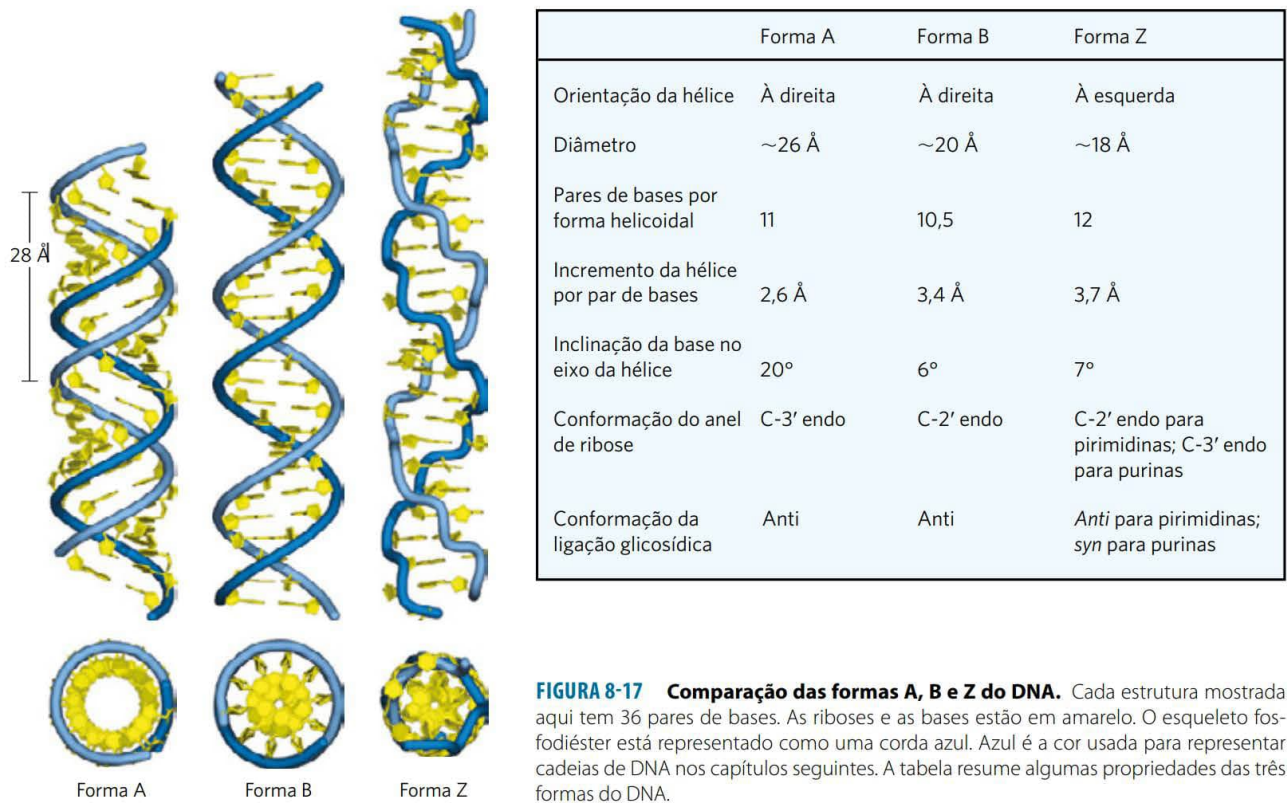


FIGURA 8-16 Variação estrutural no DNA. (a) A conformação de um nucleotídeo no DNA é afetada pela rotação de aproximadamente sete ligações diferentes. Seis dessas ligações giram livremente. Uma rotação limitada da ligação 4 origina uma dobra no anel. Essa conformação é endo ou exo, dependendo de se o átomo se encontra no mesmo lado do plano como C-5' ou no lado oposto (ver **Figura 8-3b**). (b) Para bases púricas nos nucleotídeos, apenas duas conformações relacionadas às unidades de ribose ligadas são permitidas estericamente, *anti* ou *syn*. As pirimidinas ocorrem na conformação *anti*.

do DNA. Duas variantes estruturais que tiveram suas estruturas cristalográficas bem caracterizadas são as **formas A e Z**. Essas três conformações de DNA estão mostradas na **Figura 8-17**, com um resumo das suas propriedades. A forma A é favorecida em muitas soluções que são relativamente livres de água. O DNA é ainda organizado na forma de dupla-hélice à direita, porém a hélice é mais larga, e o número de bases por volta helicoidal é 11, em vez de 10,5, como no B-DNA. O plano dos pares de bases no A-DNA está inclinado em cerca de 20°, relativo aos pares de bases do B-DNA, então os pares de bases no A-DNA não estão perfeitamente perpendiculares ao eixo da hélice. Essas mudanças estruturais aprofundam o sulco maior, ao passo que tornam o sulco menor mais superficial. Os reagentes usados para promover a cristalização de DNA tendem a desidratá-lo, e, assim, a maioria das moléculas de DNA pequenas tende a cristalizar na forma A.

A forma Z do DNA é um afastamento mais radical da estrutura B; a diferença mais óbvia é a rotação helicoidal à esquerda. Nessa forma, são encontrados 12 pares de bases por volta helicoidal, e a estrutura aparece mais delgada e alongada. O esqueleto de DNA adquire uma aparência de zigue-zague. Certas sequências nucleotídicas dobram em hélices Z à esquerda muito mais facilmente que outras. Exemplos proeminentes são sequências em que pirimidi-



nas alternam com purinas, principalmente alternando resíduos C e G (i.e., na hélice, alternando o pareamento C≡G e G≡C) ou resíduos 5-metil-C e G. Para formar a hélice à esquerda no Z-DNA, os resíduos púricos mudam para a conformação *syn*, alternando com pirimidinas na conformação *anti*. O sulco maior é pouco aparente no Z-DNA, e o sulco menor é estreito e profundo.

A ocorrência do A-DNA em células é duvidosa, mas existem evidências para algumas pequenas extensões (trechos) do Z-DNA em bactérias e em eucariotos. Esses trechos de Z-DNA podem ter um papel (até agora não definido) na regulação da expressão de alguns genes ou na recombinação genética.

Certas sequências de DNA adotam estruturas incomuns

Outras variações estruturais dependentes de sequência encontradas em cromossomos grandes podem afetar a função e o metabolismo dos segmentos de DNA em suas adjacências. Por exemplo, ocorrem curvaturas na hélice de DNA sempre que quatro ou mais resíduos de adenosina aparecem sucessivamente em uma cadeia. Seis adenosinas, uma após a outra, produzem uma curvatura de cerca de 18°. A curvatura observada nessa e em outras sequências pode ser importante na ligação de algumas proteínas ao DNA.

Um tipo comum de sequência de DNA é um **palíndromo**. Um palíndromo é uma palavra ou frase escrita de forma idêntica se for lida da esquerda para a direita ou vice-versa; dois exemplos são OMISSÍSSIMO e LUZ AZUL. No DNA, o termo é aplicado a regiões de DNA com **repetições inver-**

tidas, de modo que uma sequência invertida e autocomplementar em uma cadeia é repetida na orientação oposta na cadeia complementar, como na **Figura 8-18**. A autocomplementaridade dentro de cada cadeia confere o potencial para formar estruturas **cruciformes** (em forma de cruz) ou em **grampo** (**Figura 8-19**). Quando a repetição invertida ocorre dentro de cada cadeia individual de DNA, a sequência é denominada **repetição de imagem especular**. As repetições de imagem especular não têm sequências comple-

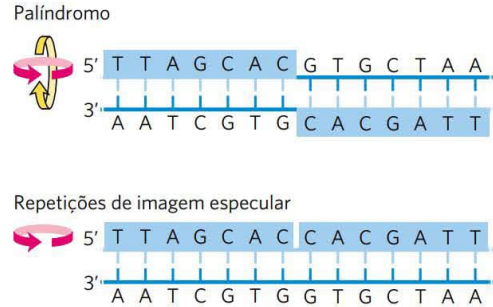


FIGURA 8-18 Palíndromos e repetições de imagem especular. Palíndromos são sequências de ácidos nucleicos de dupla-fita com simetria dupla. Para sobrepor uma repetição (sequência sombreada) na outra, ela deve ser girada 180° em torno do eixo horizontal, e então 180° em torno do eixo vertical, como mostrado pelas setas coloridas. Uma repetição de imagem especular, por outro lado, tem uma sequência simétrica dentro de cada cadeia. Sobrepor uma repetição na outra requer apenas uma única rotação de 180° em torno do eixo vertical.

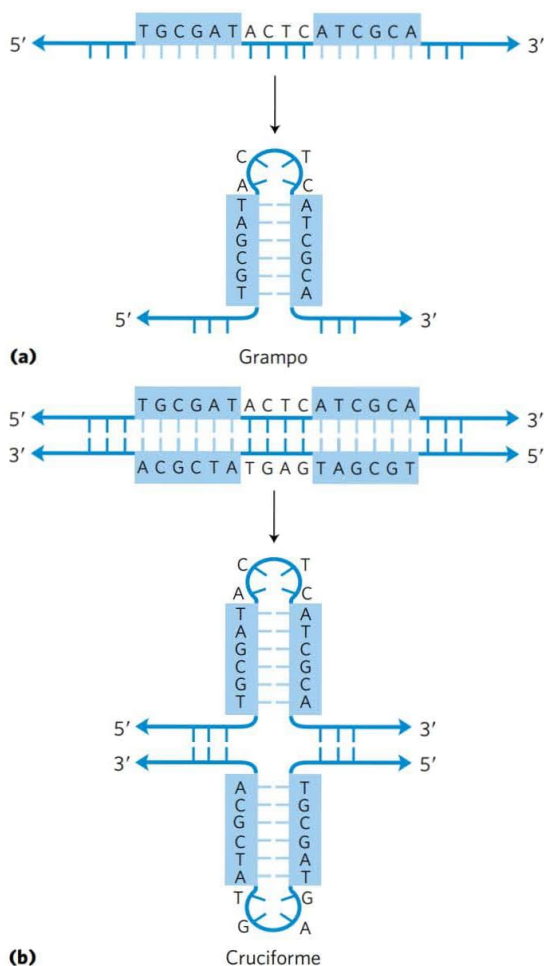


FIGURA 8-19 Grampos e estruturas cruciformes. Sequências de DNA (ou RNA) palindrômicas podem formar estruturas alternativas com pareamento de bases intracadeia. **(a)** Quando somente uma única cadeia de DNA (ou RNA) está envolvida, a estrutura é chamada de grampo. **(b)** Quando ambas as cadeias do duplex de DNA estão envolvidas, a estrutura é chamada de cruciforme. O sombreado em azul realça sequências assimétricas que podem parear com sequências complementares tanto na mesma cadeia quanto na cadeia complementar.

mentares dentro da mesma cadeia e não formam grampos ou estruturas cruciformes. Sequências desses tipos são encontradas em praticamente cada grande molécula de DNA e podem abranger poucos ou milhares de pares de bases. O número de palíndromos que ocorrem como cruciformes em células não é conhecido, embora algumas estruturas cruciformes tenham sido demonstradas *in vivo* em *Escherichia coli*. As sequências autocomplementares produzem enovelamentos de cadeias simples de DNA (ou RNA) isoladas em solução para se dobrar em estruturas complexas contendo múltiplos grampos.

Várias estruturas incomuns de DNA são formadas por três ou até quatro cadeias de DNA. Os nucleotídeos que participam de um par de bases de Watson-Crick (Figura 8-11) podem formar ligações de hidrogênio adicionais com

um terceiro filamento, particularmente com grupos funcionais ancorados no sulco principal. Por exemplo, o resíduo de guanósina de um par de nucleotídeos G≡C pode parear com um resíduo de citidina (se protonado) numa terceira cadeia (**Figura 8-20a**); a adenósina de um par A=T pode parear com um resíduo de timidina. O N-7, o O⁶ e o N⁶ das purinas, os átomos que participam na ligação de hidrogênio do triplex de DNA, frequentemente são denominados **posições de Hoogsteen**, e o pareamento do tipo não Watson-Crick é chamado de **pareamento de Hoogsteen**, em homenagem a Karst Hoogsteen, que, em 1963, reconheceu, pela primeira vez, o potencial desses pareamentos incomuns. O pareamento de Hoogsteen permite a formação de **triplex de DNA**. Os triplex mostrados na Figura 8-20 (a, b) são mais estáveis em pH baixo, uma vez que o trio C≡G·C⁺ requer uma citosina protonada. No triplex, o pK_a dessa citosina é menor do que 7,5, diferente do seu valor normal, de 4,2. Os triplex também se formam mais facilmente em sequências longas contendo somente pirimidinas ou somente purinas em uma dada cadeia. Alguns triplex de DNA contêm duas cadeias púricas e uma cadeia pirimídica; outros contêm duas cadeias púricas e uma cadeia pirimídica.

Quatro cadeias de DNA também podem parear para formar um tetraplex (quadruplex), mas isso ocorre facilmente apenas para sequências de DNA com uma proporção muito alta de resíduos de guanósina (Figura 8-20c, d). O tetraplex da guanósina, ou **tetraplex G**, é bastante estável em uma faixa ampla de condições. A orientação das cadeias em um tetraplex pode variar, como mostrado na Figura 8-20e.

No DNA de células vivas, sítios reconhecidos por muitas proteínas ligantes de DNA em sequências específicas (Capítulo 28) estão organizados como palíndromos, e sequências polipirimídicas ou polipúricas que podem formar triplas-hélices são encontradas dentro de regiões envolvidas na regulação de expressão de alguns genes eucarióticos. A princípio, cadeias de DNA sintéticas, desenhadas para parear com essas sequências para formar triplex de DNA, podem interromper a expressão gênica. Essa abordagem para controlar o metabolismo celular é de interesse comercial pela sua potencial aplicação na medicina e na agricultura.

RNA mensageiros codificam para cadeias polipeptídicas

Agora, o foco será a expressão da informação genética que o DNA contém. O RNA, a segunda maior forma de ácidos nucleicos nas células, tem muitas funções. Na expressão gênica, o RNA atua como intermediário pelo uso da informação codificada no DNA para especificar a sequência de aminoácidos da proteína funcional.

Uma vez que o DNA de eucariotos é basicamente confinado no núcleo, ao passo que a síntese proteica ocorre nos ribossomos no citoplasma, alguma outra molécula que não o DNA deve carregar a mensagem genética do núcleo para o citoplasma. Já por volta da década de 1950, o RNA foi considerado o candidato lógico: o RNA é encontrado tanto no núcleo quanto no citoplasma, e um aumento na síntese proteica é acompanhado por um aumento na quan-

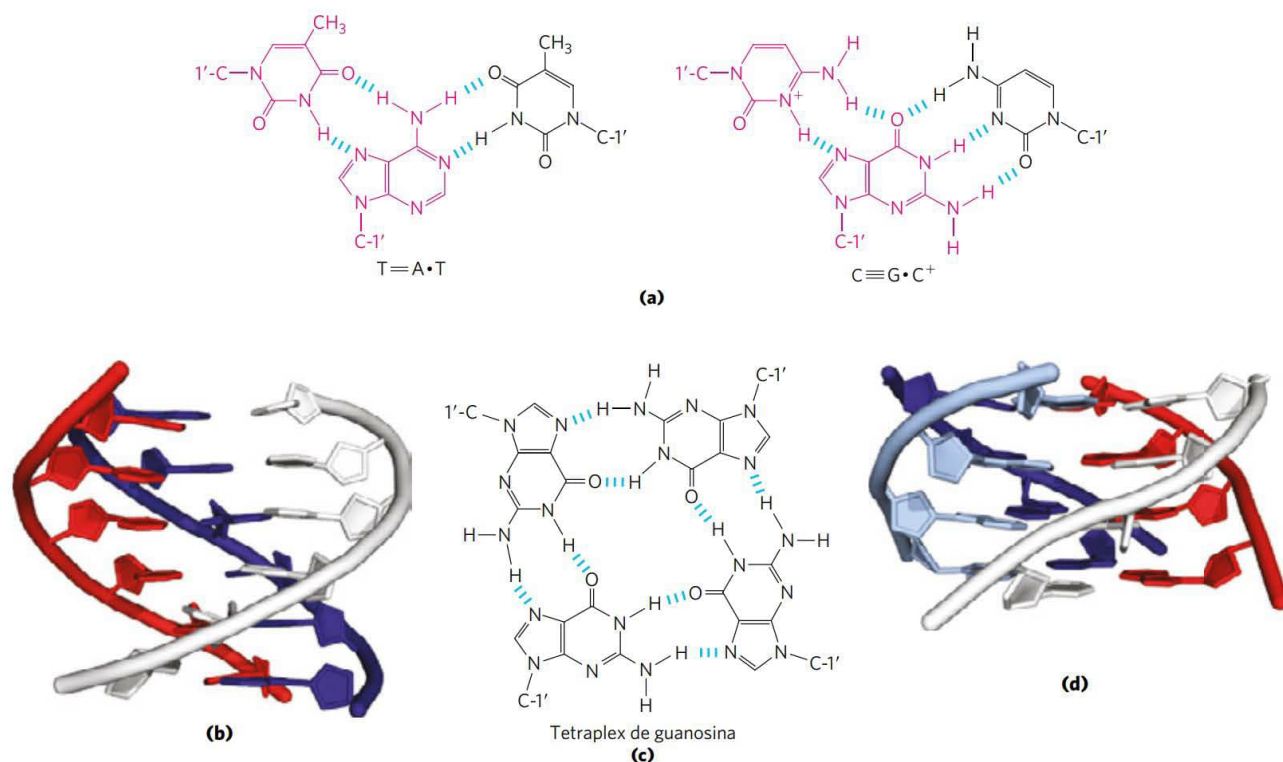


FIGURA 8-20 Estruturas de DNA contendo três ou quatro cadeias de DNA. (a) Padrões de pareamento de bases em uma forma bem caracterizada de triplex de DNA. O par de Hoogsteen em cada caso é mostrado em vermelho. (b) DNA helicoidal triplo contendo duas cadeias de pirimidina (em vermelho e branco; sequência TTCCT) e uma cadeia de purina (em azul; sequência AAGGAA). As cadeias em azul e em branco são antiparalelas e pareadas pelo padrão normal de pareamento de Watson-Crick. A terceira cadeia (toda pirimídica) (em vermelho) é paralela à cadeia púrica e pareada por meio de ligações de hidrogênio do tipo não Watson-Crick. O triplex é visto lateralmente, mostrando seis tripletes. (c) Padrão do pareamento de bases na estrutura tetraplex da guanosina. (d) Quatro tetrapletes sucessivos de uma estrutura tetraplex G. (e) Possíveis variantes na orientação das cadeias em um tetraplex G. [Fontes: (b) modificada a partir de PDB ID 1BCE, J. L. Asensio et al., *Nucleic Acids Res.* 26:3677, 1998. (d) PDB ID 244D, G. Laughlan et al., *Science* 265:520, 1994.]

tidade de RNA citoplásmico e um aumento da sua taxa de renovação. Essas e outras observações levaram vários pesquisadores a sugerir que o RNA carrega a informação genética do DNA para a maquinaria biossintética proteica do ribossomo. Em 1961, François Jacob e Jacques Monod apresentaram uma descrição consistente (e essencialmente correta) de muitos aspectos desse processo. Eles propuseram o nome “RNA mensageiro” (mRNA) para aquela porção do RNA celular total carregando a informação genética do DNA para os ribossomos. Os mRNA são formados a partir de um molde de DNA pelo processo de **transcrição**. Quando atingem os ribossomos, os mensageiros fornecem os modelos que especificam as sequências de aminoácidos nas cadeias polipeptídicas. Embora os

mRNA de diferentes genes possam variar muito em tamanho, os mRNA de um gene em particular geralmente têm um tamanho definido.

Em bactérias e arqueobactérias, uma única molécula de mRNA pode codificar para uma ou várias cadeias polipeptídicas. Se ela carrega o código para somente um polipeptídeo, o mRNA é **monocistrônico**; se ela codifica para dois ou mais polipeptídeos diferentes, o mRNA é **policistrônico**. Em eucariotos, a maioria dos mRNA é monocistrônica. (Para a finalidade dessa discussão, “cistron” refere-se a um gene. O termo por si só tem raízes históricas na ciência da genética, e sua definição genética formal vai além do escopo deste texto.) O comprimento mínimo de um mRNA é determinado pelo comprimento da cadeia polipeptídica para

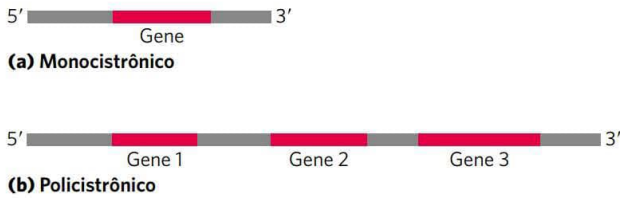


FIGURA 8-21 mRNA bacteriano. Diagrama esquemático mostrando mRNA (a) monocistônico e (b) policistônico de bactérias. Os segmentos em vermelho representam RNA que codifica para um produto gênico; os segmentos em cinza representam RNA não codificante. No transcrito policistônico, o RNA não codificante separa os três genes.

a qual ele codifica. Por exemplo, uma cadeia polipeptídica de 100 resíduos de aminoácidos requer uma sequência codificante de RNA de pelo menos 300 nucleotídeos, uma vez que cada aminoácido é codificado por um grupo de três nucleotídeos (este e outros detalhes de síntese proteica serão discutidos no Capítulo 27). Entretanto, mRNA transcritos a partir de DNA são sempre um pouco mais longos que o comprimento necessário para a codificação simples de uma sequência (ou sequências) polipeptídica. A porção adicional não codificante do RNA inclui sequências que regulam a síntese proteica. A **Figura 8-21** resume a estrutura geral de mRNA bacterianos.

Muitos RNA têm estruturas tridimensionais mais complexas

O RNA mensageiro é somente uma de várias classes de RNA celular. Os RNA transportadores são moléculas adaptadoras que atuam na síntese de proteína; ligados covalentemente a um aminoácido em uma extremidade, cada tRNA faz pareamento com o mRNA de forma que os aminoácidos sejam unidos a um polipeptídeo em crescimento na sequência correta. Os RNA ribossômicos são componentes dos ribossomos. Existe também uma grande variedade de RNA de função especial, incluindo alguns (chamados de ribozimas) que têm atividade enzimática. Todos os RNA serão considerados detalhadamente no Capítulo 26. As funções diversas e muitas vezes complexas desses RNA refletem a diversidade de uma estrutura muito mais rica do que a observada em moléculas de DNA.

O produto de transcrição do DNA é sempre RNA de fita simples. A cadeia simples tende a assumir a conformação helicoidal à direita dominada por interações de empilhamento de bases (**Figura 8-22**), as quais são mais fortes entre duas purinas do que entre uma purina e uma pirimidina ou entre duas pirimidinas. A interação purina-purina é tão forte que uma pirimidina separando duas purinas é muitas vezes deslocada do padrão de empilhamento, de forma que as purinas possam interagir. Qualquer sequência autocomplementar na molécula produz estruturas mais complexas. O RNA pode fazer pareamento de bases com regiões complementares de RNA ou de DNA. O pareamento de bases é igual ao padrão para DNA: G pareia com C e A pareia com U (ou com o ocasional resíduo de T em alguns RNA). Uma diferença é que o pareamento de bases entre resíduos de G e U é permitido no RNA (ver **Figura 8-24**), quando sequências complementares nas duas cadeias simples de RNA

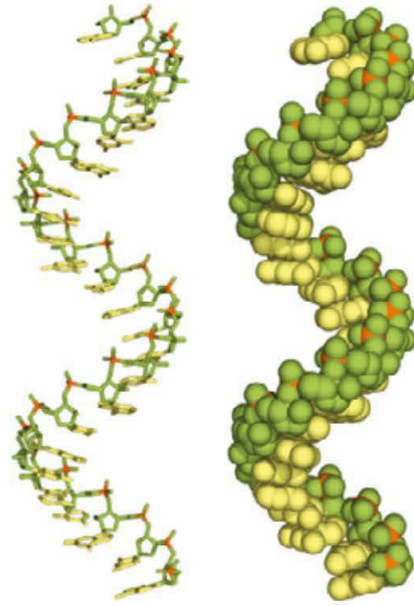


FIGURA 8-22 Padrão típico de empilhamento à direita de RNA de fita simples. As bases estão mostradas em amarelo, os átomos de fósforo em cor de laranja e as riboses e os oxigênios dos fosfatos em verde. Verde é usado para representar cadeias de RNA nos capítulos seguintes, assim como azul é usado para o DNA.

(ou dentro de uma única fita de RNA que se dobra sobre si mesma para alinhar os resíduos) pareiam uma com a outra. As cadeias pareadas no RNA ou nos duplex RNA-DNA são antiparalelas, como no DNA.

Quando duas cadeias de RNA com sequências perfeitamente complementares estão pareadas, a estrutura predominante de cadeia dupla é uma dupla-hélice de forma A, à direita. No entanto, as cadeias de RNA que estão perfeitamente pareadas em longas regiões de sequência são incomuns. As estruturas tridimensionais de muitos RNA, como aquelas das proteínas, são complexas e únicas. Interações fracas, principalmente interações de empilhamento, ajudam a estabilizar as estruturas de RNA, assim como elas o fazem no DNA. As hélices na forma Z foram feitas em laboratório (sob condições de alta salinidade e alta temperatura). A forma B do RNA ainda não foi observada. Quebras na hélice normal de forma A, causadas pelo pareamento incorreto ou não pareamento de bases em uma ou ambas as cadeias, são comuns e resultam em protuberâncias ou alças internas (**Figura 8-23**). Alças do tipo grampos se formam entre sequências autocomplementares (palindrômicas) vizinhas. Extensos segmentos helicoidais de pares de base são formados em muitos RNA (**Figura 8-24**), e os grampos resultantes são o tipo mais comum de estrutura secundária no RNA. Sequências de bases específicas pequenas (assim como UUCG) são, muitas vezes, encontradas no final de grampos de RNA e são conhecidas por formarem alças particularmente firmes e estáveis. Essas sequências podem agir como pontos de partida para o enovelamento de uma molécula de RNA na sua estrutura tridimensional exata. Outras contribuições são feitas pelas ligações de hidrogênio que não fazem par-

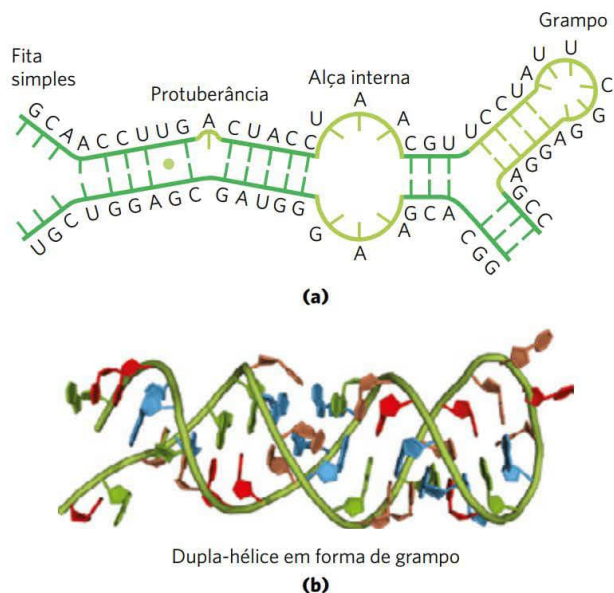
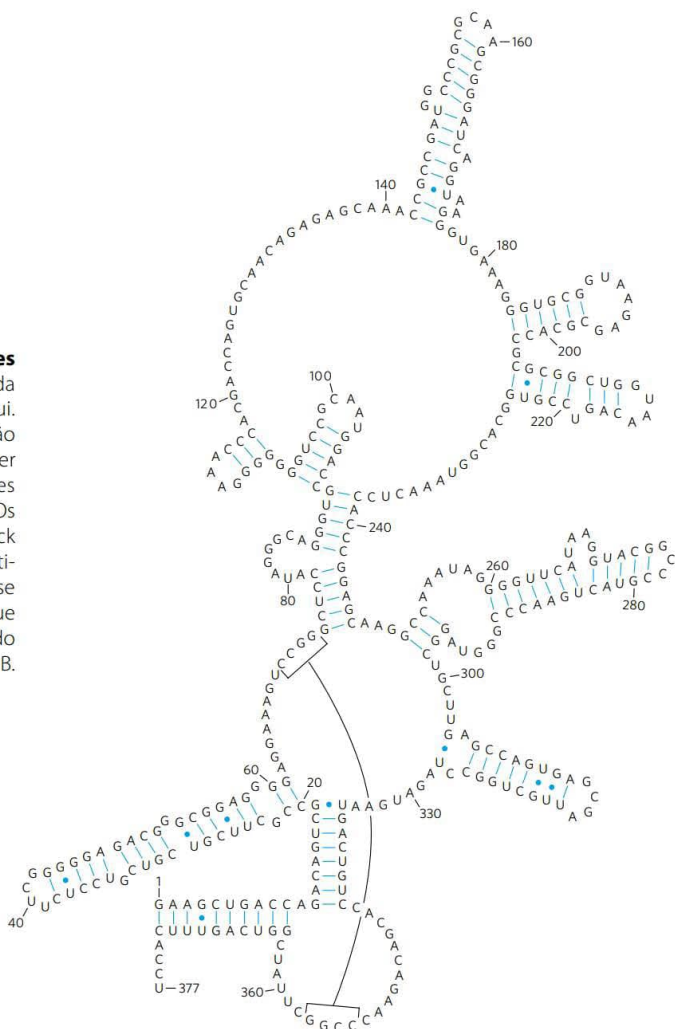
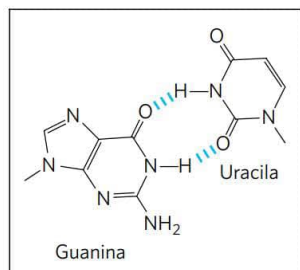


FIGURA 8-23 Estrutura secundária de RNA. (a) Protuberância, alça interna e grampo. (b) As regiões pareadas geralmente têm uma hélice à direita na forma A, como mostrado para um grampo. [Fonte: (b) modificada a partir de PDB ID 1GID, J. H. Cate et al., *Science* 273:1678, 1996.]

te do pareamento de bases padrão do tipo Watson-Crick. Por exemplo, o grupo 2'-hidroxila da ribose pode formar ligações de hidrogênio com outros grupos. Algumas dessas propriedades são evidentes na estrutura do RNA transportador de fenilalanina de levedura – o tRNA responsável pela inserção de resíduos de Phe nos polipeptídeos – e em duas enzimas de RNA, ou ribozimas, cujas funções, assim como as das enzimas proteicas, dependem das suas estruturas tridimensionais (**Figura 8-25**).

A análise da estrutura do RNA e a relação entre estrutura e função compõem um campo emergente de pesquisa com muitas das mesmas complexidades da análise de estrutura proteica. A importância da compreensão da estrutura do RNA cresce à medida que surgem mais informações sobre o grande número de papéis funcionais das moléculas de RNA.

FIGURA 8-24 Estruturas helicoidais de pareamento de bases no RNA. A possível estrutura secundária do componente RNA M1 da enzima RNase P de *E. coli*, com muitos grampos, está mostrada aqui. A RNase P, a qual também contém um componente proteico (não mostrado), funciona no processamento dos RNA transportadores (ver Figura 26-26). Os dois colchetes indicam sequências complementares adicionais que podem estar pareadas na estrutura tridimensional. Os pontos azuis indicam pares de bases G=U do tipo não Watson-Crick (inserção no quadro). Observe que pares de bases G=U são permitidos somente quando cadeias pré-sintetizadas de RNA se dobram ou se anelam umas com as outras. Não há RNA-polimerases (as enzimas que sintetizam RNA a partir de um molde de DNA) para inserir uma U tendo como molde uma G, ou vice-versa, durante a síntese de RNA. [Fonte: B. D. James et al., *Cell* 52:19, 1988.]



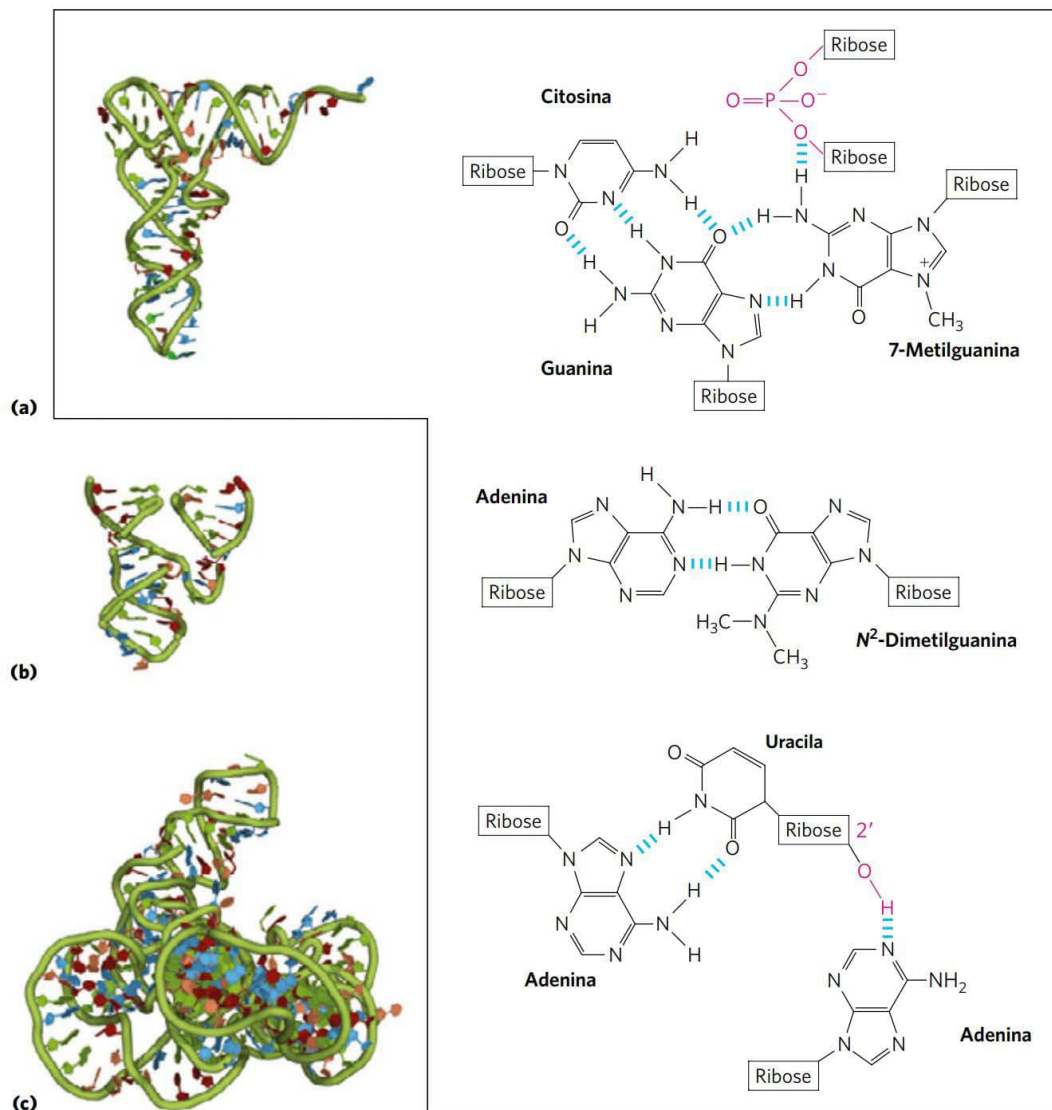


FIGURA 8-25 Estrutura tridimensional do RNA. (a) Estrutura tridimensional do tRNA de fenilalanina de levedura. Alguns padrões de pareamento de bases incomuns encontrados neste tRNA estão mostrados. Observe também o envolvimento do oxigênio de uma ligação fosfodiéster da ribose em um arranjo de ligação de hidrogênio e um grupo 2'-hidroxila da ribose em outro (ambos em vermelho). (b) Ribozima cabeça-de-martelo (assim denominada devido à estrutura secundária do sítio ativo que parece a cabeça de um martelo), derivada de certos vírus de plantas. As ribozimas, ou enzimas de RNA, catalisam uma variedade de reações, principalmente no metabolismo de RNA e na síntese proteica. As estruturas tridimensionais complexas desses RNA refletem a complexidade inerente na catálise, como descrito para enzimas proteicas no Capítulo 6. (c) Um segmento de mRNA conhecido como íntron, do protozoário ciliado *Tetrahymena thermophila*. Esse íntron (uma ribozima) catalisa sua própria excisão do meio dos éxons em uma cadeia de mRNA (discutido no Capítulo 26). [Fontes: (a) PDB ID 1TRA, E. Westhof e M. Sundaralingam, *Biochemistry* 25:4868, 1986. (b) Modificada a partir de PDB ID 1MME, W. G. Scott et al., *Cell* 81:991, 1995. (c) Modificada a partir de PDB ID 1GRZ, B. L. Golden et al., *Science* 282:259, 1998.]

RESUMO 8.2 Estrutura do ácido nucleico

■ Muitas linhas de evidência demonstram que o DNA carrega a informação genética. Alguns dos primeiros indícios vieram do experimento de Avery-MacLeod-McCarty, o qual demonstrou que o DNA isolado de uma linhagem bacteriana pode entrar em células de outra linhagem e transformá-las, dotando-as com algumas características hereditárias do doador. O experimento de Hershey-Chase demonstrou que o DNA de um vírus bacteriano, mas não a sua cobertura proteica, carrega a

mensagem genética para a replicação do vírus na célula hospedeira.

■ Reunindo todas as informações, Watson e Crick postularam que o DNA nativo é constituído por duas cadeias antiparalelas em uma organização de dupla-hélice com orientação à direita. Pares de bases complementares, A=T e G≡C, são formados por ligações de hidrogênio dentro hélice. Os pares de bases são empilhados perpendicularmente ao longo do eixo da dupla-hélice, a uma distância de 3,4 Å, com 10,5 pares de bases por volta.

- O DNA pode existir em várias formas estruturais. Duas variações da forma de Watson-Crick, ou B-DNA, são A-DNA e Z-DNA. Algumas variações estruturais dependentes de sequência causam enovelamentos na molécula de DNA. As cadeias de DNA com sequências específicas podem formar grampios, estruturas cruciformes, triplex de DNA ou tetraplex de DNA.
- O RNA mensageiro transfere a informação genética do DNA para os ribossomos para a síntese proteica. O RNA transportador e o RNA ribossômico também estão envolvidos na síntese proteica. O RNA pode ser complexo estruturalmente; cadeias simples de RNA podem se dobrar em grampios, regiões de cadeia dupla ou alças complexas.

8.3 Química dos ácidos nucleicos

O papel do DNA como repositório da informação genética depende, em parte, da sua estabilidade inerente. As transformações químicas que ocorrem geralmente são muito lentas na ausência de um catalisador enzimático. Entretanto, o armazenamento de longo prazo da informação inalterada é tão importante para a célula que mesmo reações muito lentas que alteram a estrutura do DNA podem ser fisiologicamente significativas. Processos como carcinogênese e envelhecimento podem estar intimamente ligados ao acúmulo lento e irreversível de alterações no DNA. Outras alterações, não destrutivas, também ocorrem e são essenciais para a função, como a separação das cadeias, que deve preceder a replicação ou a transcrição do DNA. Além de proporcionar maior compreensão dos processos fisiológicos, nosso conhecimento da química dos ácidos nucleicos nos forneceu um conjunto poderoso de tecnologias que tem aplicações em biologia molecular, na medicina e na ciência forense. Agora, serão examinadas as propriedades químicas do DNA e algumas dessas tecnologias.

DNA e RNA duplas-hélices podem ser desnaturados

Soluções de DNA nativo isolado cuidadosamente podem ser muito viscosas em pH 7,0 e em temperatura ambiente (25°C). Quando essa solução é submetida a valores de pH extremos ou a temperaturas acima de 80°C, sua viscosidade diminui drasticamente, indicando que o DNA sofreu uma mudança física. Da mesma forma que calor e valores de pH extremos desnaturam proteínas globulares, eles também causam desnaturação, ou fusão, da dupla-hélice do DNA. O rompimento das ligações de hidrogênio entre pares de bases e bases empilhadas causam desenrolamento da dupla-hélice para formar duas cadeias simples, completamente separadas uma da outra pela molécula inteira ou por parte da molécula (desnaturação parcial). Nenhuma ligação covalente no DNA é rompida (**Figura 8-26**).

A renaturação da molécula do DNA é um processo rápido de uma etapa, contanto que um segmento helicoidal duplo de pouco mais de uma dúzia de resíduos ainda mantenha as duas cadeias unidas. Quando a temperatura ou o pH retornam para a faixa em que a maioria dos organismos vivem, os segmentos desenrolados das duas cadeias espontaneamente se enrolam, ou **pareiam**, para produzir o duplex intacto (**Figura 8-26**). No entanto, se as duas ca-

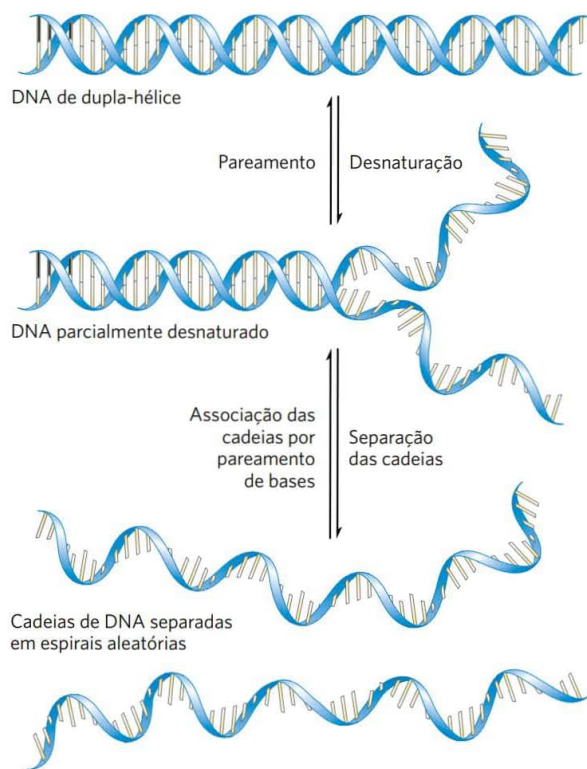


FIGURA 8-26 Desnaturação reversível e anelamento (renaturação) do DNA.

deias são separadas completamente, a renaturação ocorre em duas etapas. Na primeira, relativamente lenta, as duas cadeias “acham” uma à outra por colisões aleatórias e formam um segmento pequeno de dupla-hélice complementar. A segunda etapa é muito mais rápida: as bases não pareadas remanescentes vêm sucessivamente se apresentando como pares de bases, e as duas cadeias se unem, como se fosse o fechamento de um “zíper”, para formar a dupla-hélice.

A estreita interação entre bases empilhadas nos ácidos nucleicos tem o efeito de diminuir sua absorção em luz UV em comparação com a da solução com a mesma concentração de nucleotídeos livres, e a absorção diminui ainda mais quando duas cadeias complementares de ácidos nucleicos estão pareadas. Isso é chamado de efeito hipocrômico. A desnaturação de um ácido nucleico de cadeia dupla produz o resultado oposto: aumento na absorção, denominado efeito hiperocrômico. A transição do DNA de cadeia dupla para a forma desnaturada de cadeia simples pode, assim, ser detectada pelo monitoramento da absorção de luz UV em 260 nm.

Moléculas de DNA bacteriano ou viral em solução desnaturam quando são aquecidas vagarosamente (**Figura 8-27**). Cada espécie de DNA apresenta uma temperatura de desnaturação característica, ou ponto de fusão (t_m ; formalmente, a temperatura na qual a metade do DNA está presente na forma de cadeias únicas separadas): quanto maior o seu conteúdo de pares de bases G≡C, mais alto o ponto de fusão desse DNA. Isso ocorre principalmente porque, como vimos anteriormente, os pares de bases G≡C fazem mais contribuições para o empilhamento de bases do que os

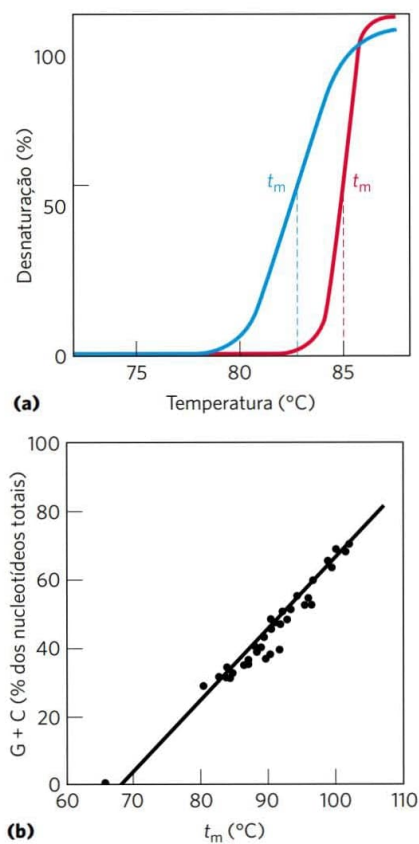


FIGURA 8-27 Desnaturação do DNA pelo calor. (a) As curvas de desnaturação, ou fusão, de duas amostras de DNA. A temperatura no ponto médio da transição (t_m) é o ponto de fusão, que depende do pH, da força iônica e do tamanho e da composição de bases do DNA. (b) Relação entre t_m e o conteúdo G + C do DNA. [Fonte: (b) adaptada a partir de J. Marmur e P. Doty, *J. Mol. Biol.* 5:109, 1962.]

pares de base A=T. Portanto, o ponto de fusão da molécula de DNA, determinado sob condições fixas de pH e força iônica, pode produzir uma estimativa da sua composição de bases. Se as condições de desnaturação forem cuidadosamente controladas, as regiões que são ricas no pareamento de bases A=T desnaturam, ao passo que a maior parte do DNA permanece em dupla-fita. Essas regiões desnaturadas (denominadas bolhas) podem ser visualizadas em microscopia eletrônica (**Figura 8-28**). Na separação das cadeias de DNA, que ocorre *in vivo* durante processos como replicação e transcrição do DNA, o local onde a separação da fita é iniciada é frequentemente rico em pares de base A=T, como será visto a seguir.

Os duplex de duas cadeias de RNA ou uma cadeia de RNA e uma cadeia de DNA (híbrido RNA-DNA) também podem ser desnaturados. Particularmente, os duplex de RNA são mais estáveis que os duplex de DNA. Em pH neutro, a desnaturação de RNA de cadeia dupla muitas vezes necessita de temperaturas de 20°C ou mais altas do que as temperaturas necessárias para a desnaturação de uma molécula de DNA com sequência semelhante. A estabilidade de

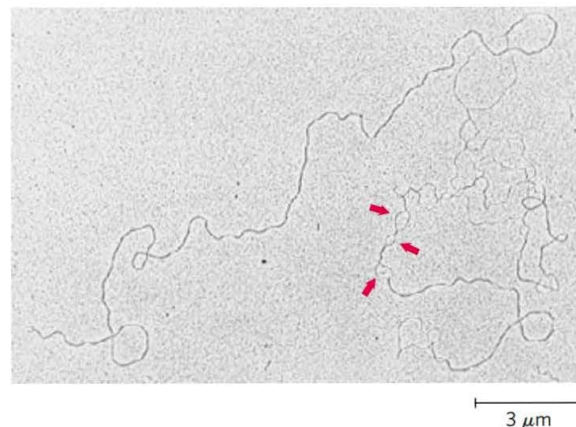


FIGURA 8-28 DNA parcialmente desnaturado. Este DNA foi parcialmente desnaturado, sendo, então, fixado para evitar renaturação durante o preparo da amostra. O método do sombreamento utilizado para visualizar o DNA nesta micrografia eletrônica aumenta seu diâmetro em aproximadamente cinco vezes e suprime a maioria dos detalhes da hélice. Entretanto, medidas de comprimento podem ser obtidas, e regiões de fita simples são facilmente distinguíveis de regiões de dupla-fita. As setas apontam para algumas bolhas de fita simples, onde a desnaturação ocorreu. As regiões que desnaturam são altamente reproduzíveis e são ricas em pareamentos de bases A=T. [Fonte: Ross B. Inman.]

um híbrido RNA-DNA geralmente é intermediária entre a do RNA e a do DNA. As bases físicas para essas diferenças em estabilidade térmica são desconhecidas.

PROBLEMA 8-1 Pareamento de bases e estabilidade do DNA

Em amostras de DNA isoladas de duas espécies de bactérias não identificadas, X e Y, a adenina constitui 32 e 17%, respectivamente, do total de bases. Que proporção relativa de adenina, guanina, timina e citosina você esperaria encontrar nas duas amostras de DNA? Que suposições você fez? Uma dessas espécies foi isolada de uma fonte de água quente (64°C). Qual espécie é a mais provável de ser uma bactéria termofílica e por quê?

Solução: para qualquer dupla-hélice de DNA, $A = T$ e $G = C$. O DNA da espécie X tem 32% de A e, portanto, deve conter 32% de T. Isso totaliza 64% das bases e deixa 36% para o pareamento $G=C$: 18% de G e 18% de C. A amostra da espécie Y, com 17% de A, deve conter 17% de T, totalizando 34% dos pares de bases. Os 66% restantes de bases são, então, distribuídos igualmente, supondo-se que ambas as moléculas de DNA estão na forma de dupla-hélice.

Quanto maior o conteúdo G + C da molécula de DNA, maior é a temperatura de fusão. A espécie Y, como apresenta o DNA com o maior conteúdo G + C (66%), é a bactéria termofílica mais provável; seu DNA tem a maior temperatura de fusão e, portanto, é mais estável na temperatura da fonte de água quente.

Nucleotídeos e ácidos nucleicos sofrem transformações não enzimáticas



Purinas e pirimidinas, juntamente com os nucleotídeos dos quais elas são parte, sofrem alterações espontâneas nas suas estruturas covalentes. A velocidade dessas reações em geral é *muito lenta*, mas essas reações são fisiologicamente significativas devido à tolerância muito baixa da célula para alterações em sua informação genética. Alterações na estrutura do DNA que produzem mudanças permanentes na informação genética codificadas pelo DNA são chamadas de **mutações**, e muitas evidências sugerem uma ligação estreita entre o acúmulo de mutações em um organismo individual e os processos de envelhecimento e carcinogênese.

Várias bases nucleotídicas sofrem perda espontânea de seus grupamentos amina exocíclicos (desaminação) (**Figura 8-29a**). Por exemplo, em condições celulares típicas, a desaminação da citosina (no DNA) para uracila ocorre em aproximadamente um em cada 10^7 resíduos de citidina em 24 horas. Esta taxa de desaminação corresponde a cerca de 100 eventos espontâneos por dia, em média, em uma célula de mamífero. A desaminação de adenina e guanina ocorre em taxas de cerca de 1/100.

A reação lenta de desaminação da citosina parece inócua o suficiente, mas é quase seguramente a razão pela qual o DNA contém timina, em vez de uracila. O produto da desaminação da citosina (uracila) é rapidamente reconhecido como estranho no DNA, sendo removido pelo sistema de reparo (Capítulo 25). Se o DNA normalmente contivesse uracila, o reconhecimento de uracilas resultantes da desaminação da citosina seria mais difícil, e uracilas não reparadas conduziriam a mudanças permanentes na sequência, fazendo o pareamento com adeninas durante a replicação. A desaminação da citosina gradualmente conduziria a uma diminuição nos pares de bases G≡C e a um aumento nos pares de bases A≡U no DNA de todas as células. Por milênios, a desaminação de citosina poderia eliminar pares de bases G≡C e o código genético que depende desses pares de bases. O estabelecimento da timina como uma das quatro bases no DNA pode ter sido um dos pontos cruciais de reviravolta na evolução, tornando possível o armazenamento de longo prazo da informação genética.

Outra reação importante nos desoxirribonucleotídeos é a hidrólise da ligação *N*-β-glicosil entre a base e a pentose. A base é perdida, criando uma lesão no DNA, chamada de sítio AP (apurínico, apirimidínico) ou sítio abásico (Figura 8-29b). As purinas são perdidas em uma taxa maior que as

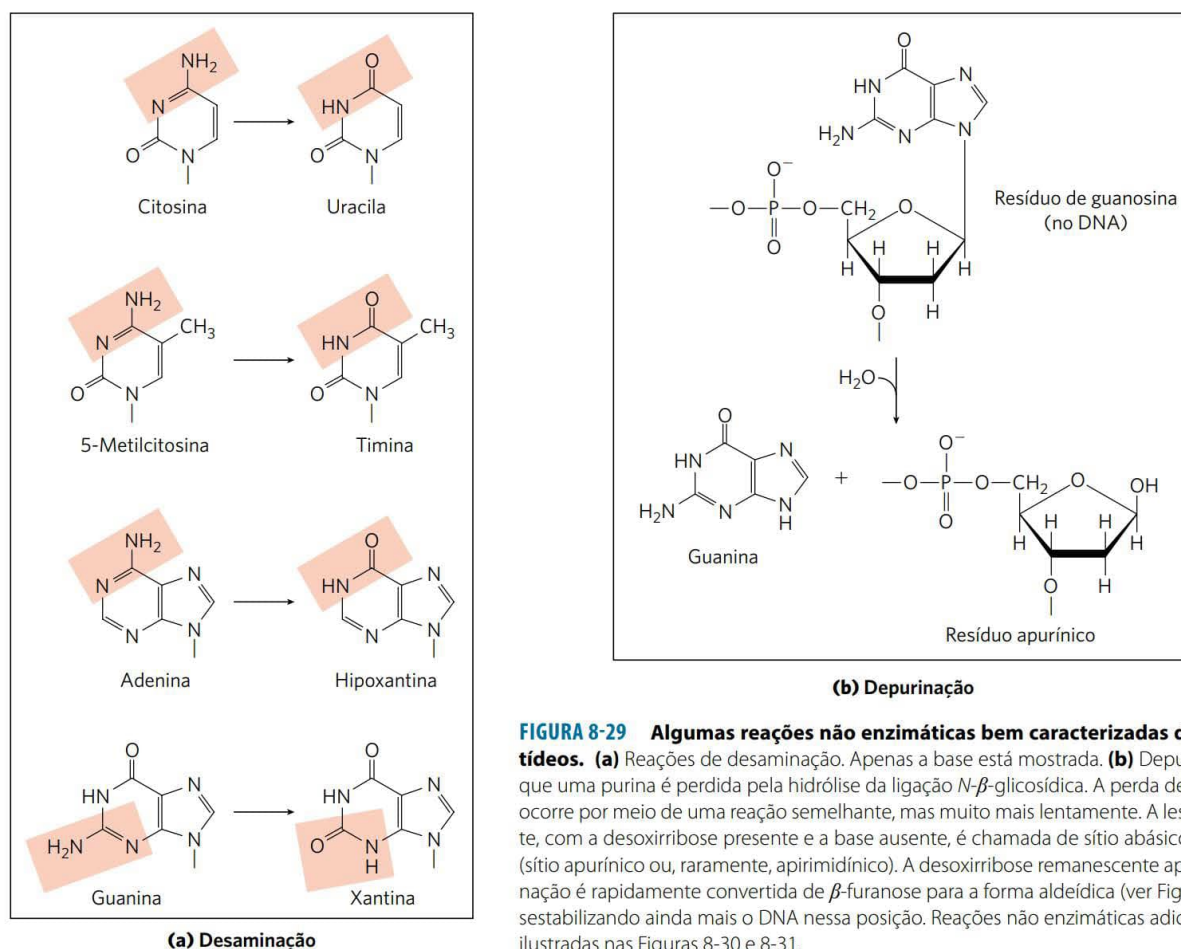


FIGURA 8-29 Algumas reações não enzimáticas bem caracterizadas dos nucleotídeos. (a) Reações de desaminação. Apenas a base está mostrada. (b) Depurinação, em que uma purina é perdida pela hidrólise da ligação *N*-β-glicosídica. A perda de pirimidinas ocorre por meio de uma reação semelhante, mas muito mais lentamente. A lesão resultante, com a desoxirribose presente e a base ausente, é chamada de sítio abásico ou sítio AP (sítio apurínico ou, raramente, apirimidínico). A desoxirribose remanescente após a depurinação é rapidamente convertida de β-furanose para a forma aldeídica (ver Figura 8-3), desestabilizando ainda mais o DNA nessa posição. Reações não enzimáticas adicionais estão ilustradas nas Figuras 8-30 e 8-31.

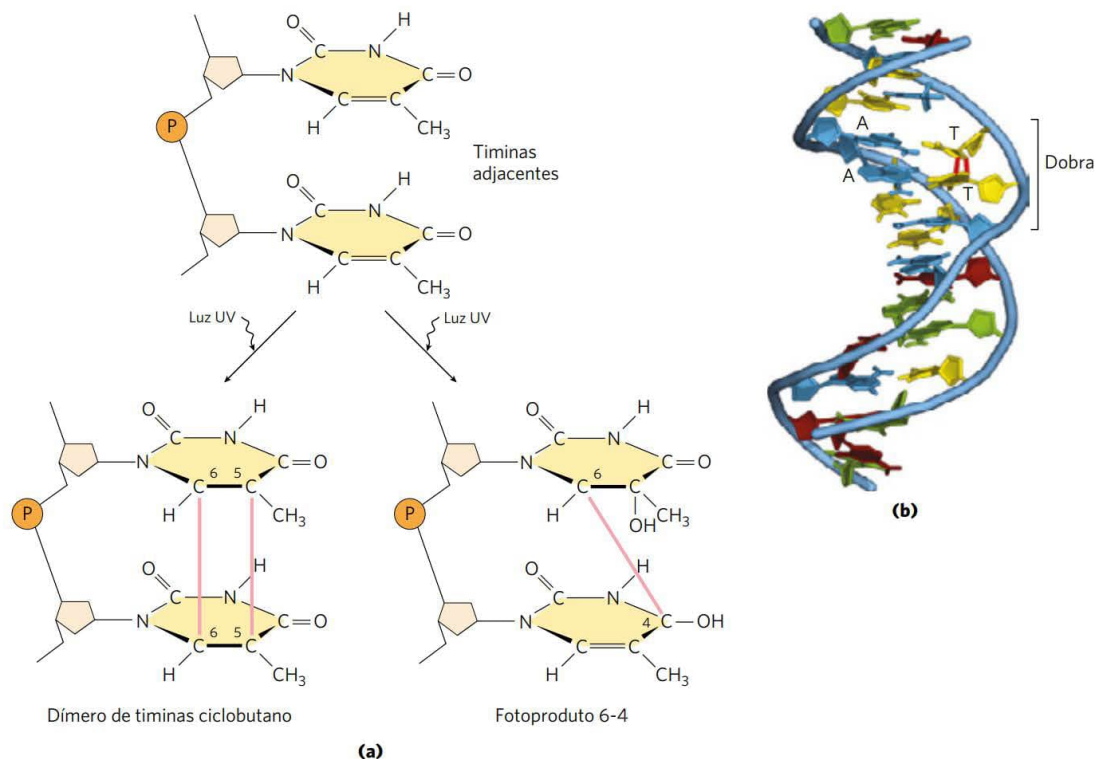


FIGURA 8-30 Formação de dímeros de pirimidinas induzidos por luz UV. **(a)** Um tipo de reação (à esquerda) resulta na formação de um anel ciclobutano envolvendo C-5 e C-6 de resíduos de pirimidinas adjacentes. Uma reação alternativa (à direita) resulta no fotoproduto 6-4, com uma ligação entre C-6 de uma pirimidina e C-4 da pirimidina vizinha. **(b)** A formação de um dímero de pirimidinas ciclobutano introduz um ângulo ou uma dobra no DNA. [Fonte: (b) PDB ID 1TTD, K. McAteer et al., *J. Mol. Biol.* 282:1013, 1998.]

pirimidinas. Cerca de uma em cada 10^5 purinas (10.000 por célula de mamíferos) é perdida do DNA a cada 24 horas em condições celulares típicas. A depurinação dos ribonucleotídeos e do RNA é muito mais lenta e menos significativa fisiologicamente. No tubo de ensaio, a perda de purinas pode ser acelerada por ácido diluído. A incubação de DNA em pH 3 causa remoção seletiva de bases púricas, resultando no seu derivado, denominado ácido apurínico.

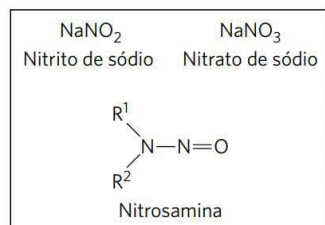
Outras reações são promovidas pela radiação. A luz UV induz a condensação de dois grupos etílenos para formar um anel ciclobutano. Na célula, a mesma reação entre bases pirimídicas adjacentes nos ácidos nucleicos forma dímeros pirimídicos ciclobutanos. Isso ocorre mais frequentemente entre resíduos de timina adjacentes na mesma hélice de DNA (**Figura 8-30**). Um segundo tipo de dímero de pirimidinas, chamado de fotoproduto 6-4, também é formado durante a irradiação UV. As radiações ionizantes (raios X e raios gama) podem causar abertura de anel e fragmentação de bases, bem como quebras dos esqueletos covalentes dos ácidos nucleicos.

Praticamente todas as formas de vida são expostas à radiação de alta energia capaz de causar mudanças químicas no DNA. Sabe-se que a radiação UV curta (com comprimento de ondas de 200 a 400 nm), que compõe uma porção significativa do espectro solar, causa a formação de dímeros de pirimidina e outras mudanças químicas no DNA de bactérias

e de células da pele humana. Os seres humanos estão sujeitos constantemente a um campo de radiações ionizantes na forma de raios cósmicos, os quais podem penetrar profundamente na terra, assim como às radiações emitidas por elementos radioativos, como rádio, plutônio, urânio, radônio, ^{14}C e ^3H . Os raios X utilizados em exames médicos e dentais e na radioterapia de câncer e outras doenças são outra forma de radiação ionizante. É estimado que radiações ionizantes e UV sejam responsáveis por cerca de 10% de todo dano no DNA causado por agentes ambientais.

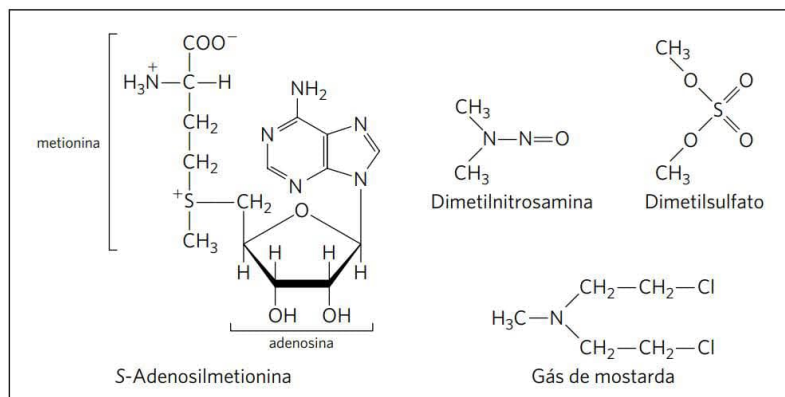
O DNA também pode ser danificado por reagentes químicos introduzidos no ambiente como produtos de atividade industrial. Esses produtos podem não ser prejudiciais por si só, mas podem ser metabolizados pelas células em formas que o são. Existem duas classes principais desses compostos (**Figura 8-31**): (1) agentes desaminantes, principalmente ácido nitroso (HNO_2) ou compostos que podem ser metabolizados a ácido nitroso ou nitritos, e (2) agentes alquilantes.

O ácido nitroso, formado a partir de precursores orgânicos, como nitrosaminas, e a partir de sais de nitrito e de nitratos, é um potente acelerador de desaminação de bases. O bissulfito tem efeitos semelhantes. Ambos os agentes são usados como conservantes em alimentos processados para evitar o crescimento de bactérias tóxicas. Eles não parecem aumentar significativamente os riscos de câncer quando



(a) Precursores do ácido nitroso

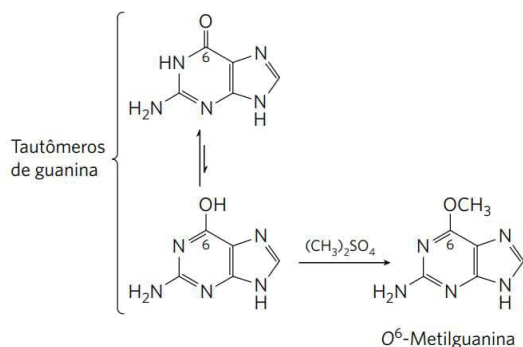
FIGURA 8-31 Agentes químicos que causam dano ao DNA. (a) Precursores de ácido nitroso, que promovem reações de desaminação. (b) Agentes alquilantes. A maioria gera nucleotídeos modificados não enzimaticamente.



(b) Agentes alquilantes

usados dessa forma, talvez pelo fato de serem usados em pequenas quantidades e de representarem apenas uma pequena contribuição para os níveis de dano no DNA. (O risco potencial para a saúde de alimentos estragados seria muito maior se esses conservantes não fossem usados.)

Agentes alquilantes podem alterar certas bases do DNA. Por exemplo, o reagente químico dimetilsulfato (Figura 8-32b) pode metilar a guanina para produzir O^6 -metilguanina, a qual não consegue parear com a citosina.



Muitas reações semelhantes são realizadas por agentes alquilantes normalmente presentes nas células, como *S*-adenosilmetionina.

A fonte mais importante de alterações mutagênicas no DNA é o dano oxidativo. Espécies reativas de oxigênio, como peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila e radicais superóxido, surgem durante a irradiação ou (mais comumente) como subproduto do metabolismo aeróbico. Essas espécies danificam o DNA por meio de qualquer uma de um grande e complexo grupo de reações, variando da oxidação de desoxirribose e porções de base a quebras de cadeias. Dessas espécies, os radicais hidroxila são responsáveis pela maioria dos danos oxidativos no DNA. As células têm um sistema de defesa elaborado para destruir espécies reativas de oxigênio, incluindo enzimas como a catalase e a superóxido-desmutase, que convertem espécies reativas de oxigênio a produtos inofensivos. Contudo, uma fração desses oxidantes inevitavelmente escapa das defesas celulares e são capazes de danificar o DNA. Estimativas precisas

da extensão desse dano não estão disponíveis, mas a cada dia o DNA de cada célula humana está sujeito a milhares de reações oxidativas que danosas.

Isso é apenas uma amostra das reações mais conhecidas que causam dano ao DNA. Muitos compostos carcinogênicos nos alimentos, na água e no ar exercem seus efeitos cancerígenos por modificações das bases do DNA. Apesar disso, a integridade do DNA como polímero é melhor mantida do que a do RNA e da proteína, pois o DNA é a única macromolécula que se beneficia de sistemas de reparo bioquímicos. Esses processos de reparo (descritos no Capítulo 25) diminuem muito o impacto do dano ao DNA. ■

Algumas bases do DNA são metiladas

Certas bases nucleotídicas em moléculas de DNA são metiladas enzimaticamente. A adenina e a citosina são metiladas com mais frequência do que a guanina e a timina. A metilação geralmente é restrita a certas sequências ou regiões da molécula de DNA. Em alguns casos, a função da metilação é bem conhecida; em outros, a função permanece obscura. Todas as metilases de DNA conhecidas usam *S*-adenosilmetionina como doador de um grupo metila (Figura 8-32b). *E. coli* tem dois sistemas notáveis de metilação. Um serve como parte de um mecanismo de defesa que ajuda a célula a distinguir seu DNA do DNA exógeno, marcando seu próprio DNA com grupos metila e destruindo o DNA (i.e., DNA exógeno) sem os grupos metila (isso é conhecido como modificação-restrição; ver p. 322). O outro sistema metila resíduos de adenosina dentro da sequência (5')GATC(3') a N^6 -metiladenosina (Figura 8-5a). Grupos metila são adicionados pela Dam (do inglês, *DNA adenine methylation*) metilase, um componente de um sistema que repara pares de bases malpareados formados ocasionalmente durante a replicação de DNA (ver Figura 25-21).

Em células eucarióticas, cerca de 5% dos resíduos de citidina no DNA são metilados a 5-metilcitidina (Figura 8-5a). A metilação é mais comum em sequências CpG, produzindo metil-CpG simetricamente em ambas as hélices do DNA. A extensão da metilação em sequências CpG varia de acordo com a região molecular em grandes moléculas de DNA eucariótico.

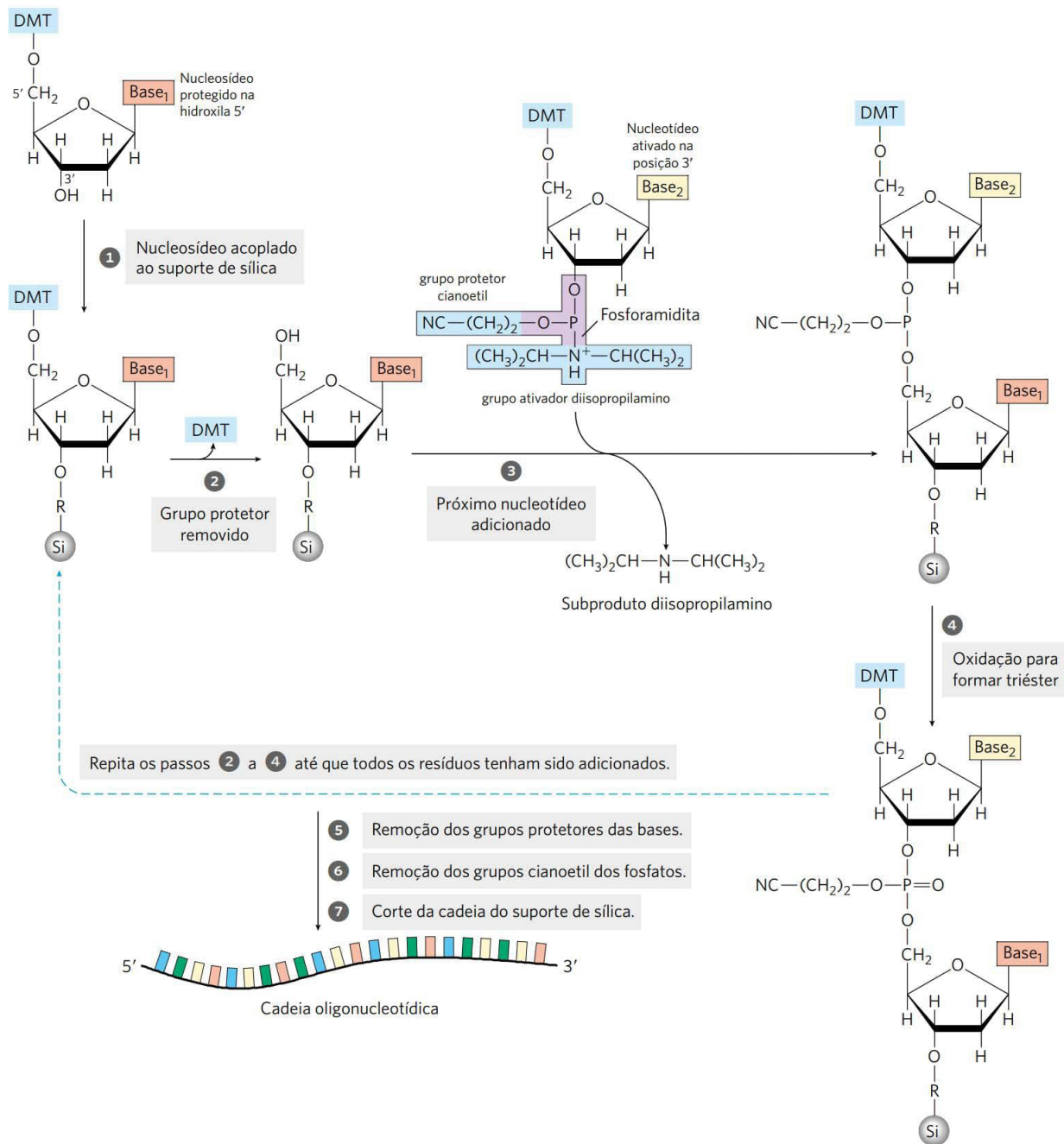


FIGURA 8-32 Síntese química de DNA pelo método do fosforamídita. A síntese de DNA automatizada é conceitualmente semelhante à síntese de polipeptídeos em um suporte sólido. O oligonucleotídeo é sintetizado no suporte sólido (sílica), um nucleotídeo por vez, em uma série repetida de reações químicas com precursores nucleotídicos adequadamente protegidos. ❶ O primeiro nucleosídeo (o qual formará a extremidade 3') é acoplado ao suporte de sílica na 3'-hidroxila (por meio de um grupamento ligante, R), sendo protegido na 5'-hidroxila com um grupo dimetoxitritil (DMT) lábil em ácido. Os grupos reativos em todas as bases também são protegidos quimicamente. ❷ O grupo DMT protetor é removido pela lavagem da coluna com ácido (o grupo DMT é colorido, então essa reação pode ser acompanhada espectrofotometricamente). ❸ O próximo nucleotídeo tem uma fosforamídita na posição 3': um fosfito trivalente (ao contrário do fosfato pentavalente mais oxidado, normalmente presente nos ácidos nucleicos) com um oxigênio ligado substituído por um grupo amina ou uma amina substituída. Na variante comum mostrada, um dos oxigênios da fosforamídita é ligado à desoxirribose, o outro é protegido por um grupo cianoetil, e a terceira posição é ocupada pelo grupo di-isopropilamino facilmente deslocável. A reação com o nucleotídeo imobilizado forma uma ligação 5',3' e o grupo di-isopropilamino é eliminado. Na etapa ❹, a ligação fosfito é oxidada com iodo para produzir uma ligação fosfotriéster. As reações ❷ a ❹ são repetidas até que todos os nucleotídeos tenham sido adicionados. Em cada etapa, o excesso de nucleotídeos é removido antes da adição do próximo nucleotídeo. Nas etapas ❺ e ❻, os grupos protetores remanescentes nas bases e nos fosfatos são removidos, e, na ❼, o oligonucleotídeo é separado do suporte sólido e purificado. A síntese química de RNA é um pouco mais complicada devido à necessidade de proteger o grupo hidroxila 2' da ribose sem afetar a reatividade do grupo hidroxila 3'.

A síntese química de DNA foi automatizada

Um importante avanço prático na química de ácidos nucleicos foi a síntese rápida e precisa de oligonucleotídeos pequenos de sequência conhecida. Os métodos foram desenvolvidos por H. Gobind Khorana e colaboradores na década de 70. Os refinamentos introduzidos por Robert Letsinger e Marvin Caruthers conduziram à química agora usada em larga escala, denominada método de fosoramidita (**Figura 8-32**). A síntese é conduzida com a cadeia em crescimento fixada a um suporte sólido, usando fundamentos semelhantes àqueles usados por Merrifield para a síntese de peptídeos (ver Figura 3-32), sendo facilmente automatizada. A eficiência de cada etapa é muito alta, permitindo a síntese rotineira de polímeros contendo 70 ou 80 nucleotídeos e, em alguns laboratórios, cadeias muito mais longas. A disponibilidade de polímeros de DNA relativamente baratos com sequências pré-projetadas revolucionou todas as áreas da bioquímica.

As sequências gênicas podem ser amplificadas com a reação em cadeia da polimerase

Os projetos genoma, como descritos no Capítulo 9, deram origem a bancos de dados *on-line* contendo as sequências completas do genoma de milhares de organismos. Se conhecermos a sequência de, pelo menos, as porções finais de um segmento de DNA em que estamos interessados, poderemos ampliar muito o número de cópias desse segmento de DNA com a **reação em cadeia da polimerase (PCR)**, um processo concebido por Kary Mullis em 1983. O DNA amplificado pode, então, ser usado para uma infinidade de propósitos, como veremos a seguir.

O procedimento de PCR, mostrado na **Figura 8-33**, baseia-se em enzimas denominadas **DNA-polimerases**. Essas enzimas sintetizam as cadeias de DNA a partir de desoxirribonucleotídeos (dNTPs), usando um modelo de DNA. As polimerases de DNA não sintetizam o DNA de novo, mas devem adicionar nucleotídeos às fitas pré-existentes, chamadas de **oligonucleotídeos iniciadores** (ou **primers**; ver Capítulo 25). Na PCR, dois oligonucleotídeos sintéticos são preparados para utilização como iniciadores da replicação que podem ser estendidos por uma DNA-polimerase. Estes oligonucleotídeos iniciadores são complementares às sequências em cadeias opostas ao DNA-alvo, posicionados de modo a que as suas extremidades 5' definam as extremidades do segmento a ser amplificado, e tornam-se parte da sequência amplificada. As extremidades 3' dos iniciadores anelados são orientadas uma em direção à outra e posicionadas para iniciar a síntese de DNA por meio do segmento de DNA-alvo.

O procedimento de PCR tem uma simplicidade elegante. A PCR básica requer quatro componentes: uma amostra de

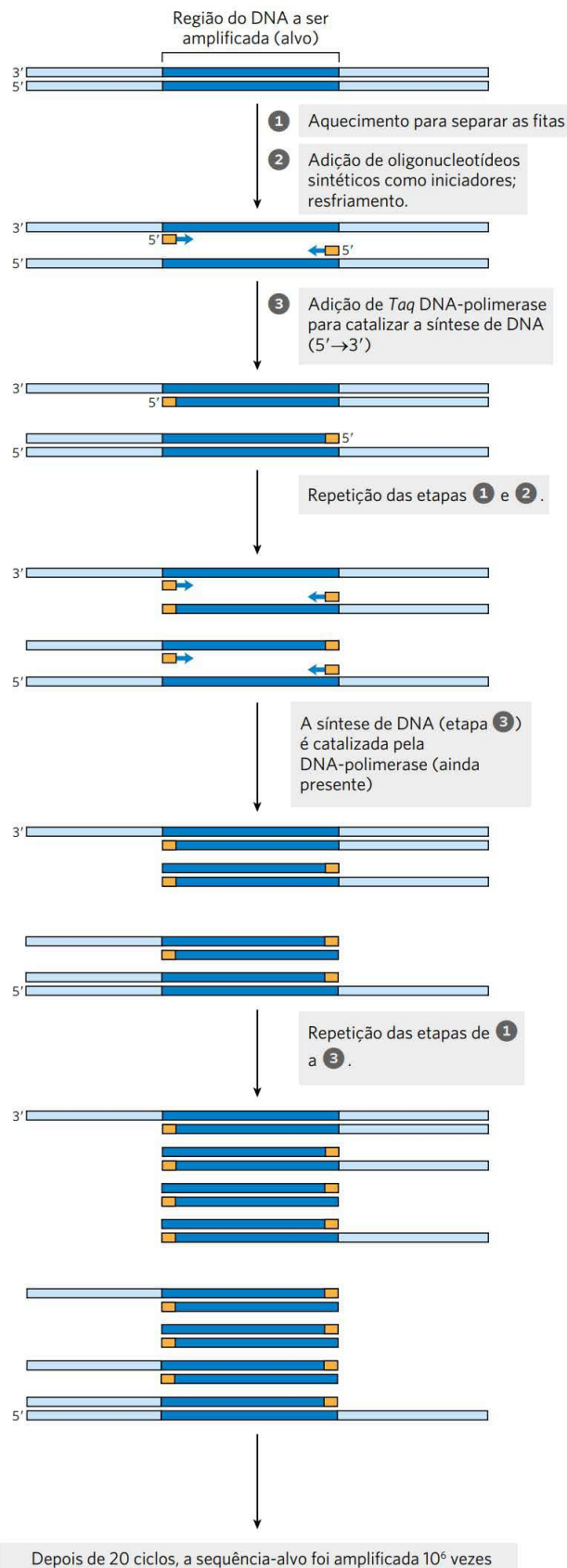


FIGURA 8-33 Amplificação de um segmento de DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR). O procedimento PCR tem três etapas. As fitas de DNA são 1 separadas pelo calor; em seguida são 2 renaturadas na presença de excesso de iniciadores de DNA sintético curto (em cor de laranja), que ficam ao lado da região que será amplificada (em azul-escuro); 3 um DNA novo é sintetizado pela polimerização catalisada pela DNA-polimerase. A *Taq* DNA-polimerase termoestável não é desnaturada pelas etapas de aquecimento. As três etapas são repetidas por 25 ou 30 ciclos em um processo automatizado realizado em um pequeno instrumento de bancada, chamado de termociclador.

DNA contendo o segmento a ser amplificado, o par de oligonucleotídeos iniciadores sintéticos, um conjunto de desoxinucleosídeos-trifosfatos e uma DNA-polimerase. Existem três etapas (Figura 8-33). Na etapa ❶, a mistura de reação é aquecida brevemente para desnaturar o DNA, separando as duas cadeias. Na etapa ❷, a mistura é resfriada, de modo que os iniciadores possam se anelar ao DNA. A concentração elevada de oligonucleotídeos iniciadores aumenta a probabilidade de renaturação com cada fita do DNA desnaturado antes que as duas fitas de DNA (presentes em concentração muito menor) possam renaturar entre si. Então, na etapa ❸, o segmento iniciado é replicado seletivamente pela DNA-polimerase, usando a mistura de dNTP. O ciclo de aquecimento, resfriamento e replicação é repetido 25 a 30 vezes ao longo de algumas horas em um processo automatizado, amplificando o segmento de DNA entre os iniciadores até que o número de cópias da amostra seja suficientemente grande para ser analisado diretamente ou clonado. A clonagem é descrita mais detalhadamente no Capítulo 9. Em resumo, o DNA amplificado é ligado a outro segmento de DNA com sequências que permitem que ele seja replicado em uma célula hospedeira. Cada ciclo de replicação duplica o número de cópias do segmento de DNA-alvo, de modo que a concentração cresce exponencialmente. As sequências de DNA flangeadoras aumentam linearmente em número, mas esse efeito se torna insignificante rapidamente. Após 20 ciclos, o segmento de DNA foi amplificado mais de 1 milhão de vezes (2^{20}); após 30 ciclos, mais de 1 bilhão de vezes. A etapa ❸ da PCR usa uma DNA-polimerase termoestável como a *Taq*-polimerase, isolada de uma bactéria termofílica (*Thermus aquaticus*), que cresce em fontes termais onde as temperaturas se aproximam do ponto de ebulição da água. A *Taq*-polimerase permanece ativa depois de cada etapa de aquecimento (etapa ❶) e não precisa ser readicionada.

Essa tecnologia é muito sensível: a PCR pode detectar e amplificar apenas uma molécula de DNA em quase qualquer tipo de amostra, incluindo algumas amostras ancestrais. A estrutura helicoidal de dupla-fita do DNA é altamente estável, mas, como vimos, o DNA se degrada lentamente ao longo do tempo por meio de várias reações não enzimáticas. A PCR permitiu a clonagem bem-sucedida de segmentos de DNA raros e não degradados, isolados de amostras com mais de 40 mil anos de idade. Os pesquisadores utilizaram a técnica para clonar fragmentos de DNA dos restos mumificados de seres humanos e de animais extintos, como o mamute, criando novos campos da arqueologia e da paleontologia molecular. O DNA de locais de sepultamento foi amplificado por PCR e usado para rastrear antigas migrações humanas (Figura 9-33). Os epidemiologistas podem utilizar amostras de DNA de restos humanos amplificadas por PCR para rastrear a evolução de vírus patogênicos humanos. Devido à sua capacidade de amplificar apenas alguns filamentos de DNA que podem estar presentes em uma amostra, a PCR é uma ferramenta potente na medicina forense (Quadro 8-1). Ela também está sendo usada para detectar infecções virais e certos tipos de câncer antes que eles causem sintomas, bem como no diagnóstico pré-natal de doenças genéticas.

Dada a extrema sensibilidade dos métodos de PCR, a contaminação de amostras constitui um sério problema. Em muitas aplicações, incluindo testes de DNA forenses e de amostras ancestrais, os controles devem ser utilizados para garantir que o DNA amplificado não seja derivado do pesquisador ou de bactérias contaminantes.

As sequências de longas hélices de DNA podem ser determinadas

Por sua capacidade de ser um repositório de informação, a propriedade mais importante de uma molécula de DNA é a sua sequência de nucleotídeos. Até o fim dos anos 70, a determinação da sequência de um ácido nucleico contendo apenas 5 ou 10 nucleotídeos era muito trabalhosa. O desenvolvimento de duas técnicas, em 1977, (uma por Allan Maxam e Walter Gilbert, a outra por Frederick Sanger) tornou possível o sequenciamento de moléculas maiores de DNA. As técnicas dependiam da melhor compreensão da química dos nucleotídeos e do metabolismo do DNA e de métodos eletroforéticos aprimorados para separar as cadeias de DNA que diferem em tamanho por apenas um nucleotídeo. (Ver Figura 3-18 para uma descrição de eletroforese em gel.)

Embora os dois métodos sejam semelhantes em estratégia, o **sequenciamento de Sanger**, também conhecido como sequenciamento de terminação de cadeia didesoxi, provou ser tecnicamente mais fácil, tornando-se a base de protocolos de sequenciamento mais modernos (Figura 8-34) ele depende da construção de uma nova cadeia de DNA. Como a PCR, esse método utiliza DNA-polimerases e um iniciador para sintetizar uma fita de DNA complementar à fita em análise. Cada desoxinucleotídeo adicionado é complementar, por meio do pareamento de bases, a uma base na cadeia-molde. No sequenciamento de Sanger, a sequência obtida é a da nova cadeia sintetizada, complementar à cadeia-molde que está sendo analisada.

Na reação catalisada pela DNA-polimerase, o grupo 3'-hidroxila do iniciador reage com um dNTP que está sendo adicionado para formar uma nova ligação fosfodiéster (Figura 8-34a). Na reação de sequenciamento de Sanger, os análogos de nucleotídeos, chamados de didesoxinucleosídeos trifosfato (ddNTP), interrompem a síntese de DNA, uma vez que se ligam à fita-molde, mas não possuem o grupo 3'-hidroxila necessário para adicionar o próximo nucleotídeo (Figura 8-34b). Por exemplo, a adição de ddCTP em pequenas quantidades a um sistema de reação contendo uma quantidade muito maior de dCTP (juntamente com os outros três dNTP) leva à competição toda vez que a DNA-polimerase encontra um G na fita-molde. Em geral, dC é adicionado, e a síntese da fita continua. Às vezes, o ddC é adicionado no lugar do dC, e a fita será terminada nessa posição. Assim, uma pequena fração das fitas sintetizadas é terminada prematuramente em todas as posições em que dC seria normalmente adicionado, complementar a cada dG na fita-molde. Dado o excesso de dCTP sobre ddCTP, a chance do análogo ser incorporado, em vez de dC, é pequena. Todavia, uma quantidade suficiente de ddCTP está presente para garantir que cada nova cadeia tenha uma alta probabilidade de adquirir pelo menos um ddC em algum ponto (em um ou outro dos resíduos G na fita-molde) durante a síntese. O resultado é uma solução contendo uma mistura de fragmentos, cada um terminando com um resíduo ddC. Cada resíduo G no modelo gera fragmentos com terminação C de um comprimento específico. Os fragmentos de tamanhos diferentes, separados por eletroforese, revelam a localização dos resíduos C na fita de DNA sintetizada.

Quando esse procedimento foi desenvolvido pela primeira vez, o processo foi repetido separadamente para cada um dos quatro ddNTP. Iniciadores marcados radioativamente permitiram aos pesquisadores detectar os fragmentos

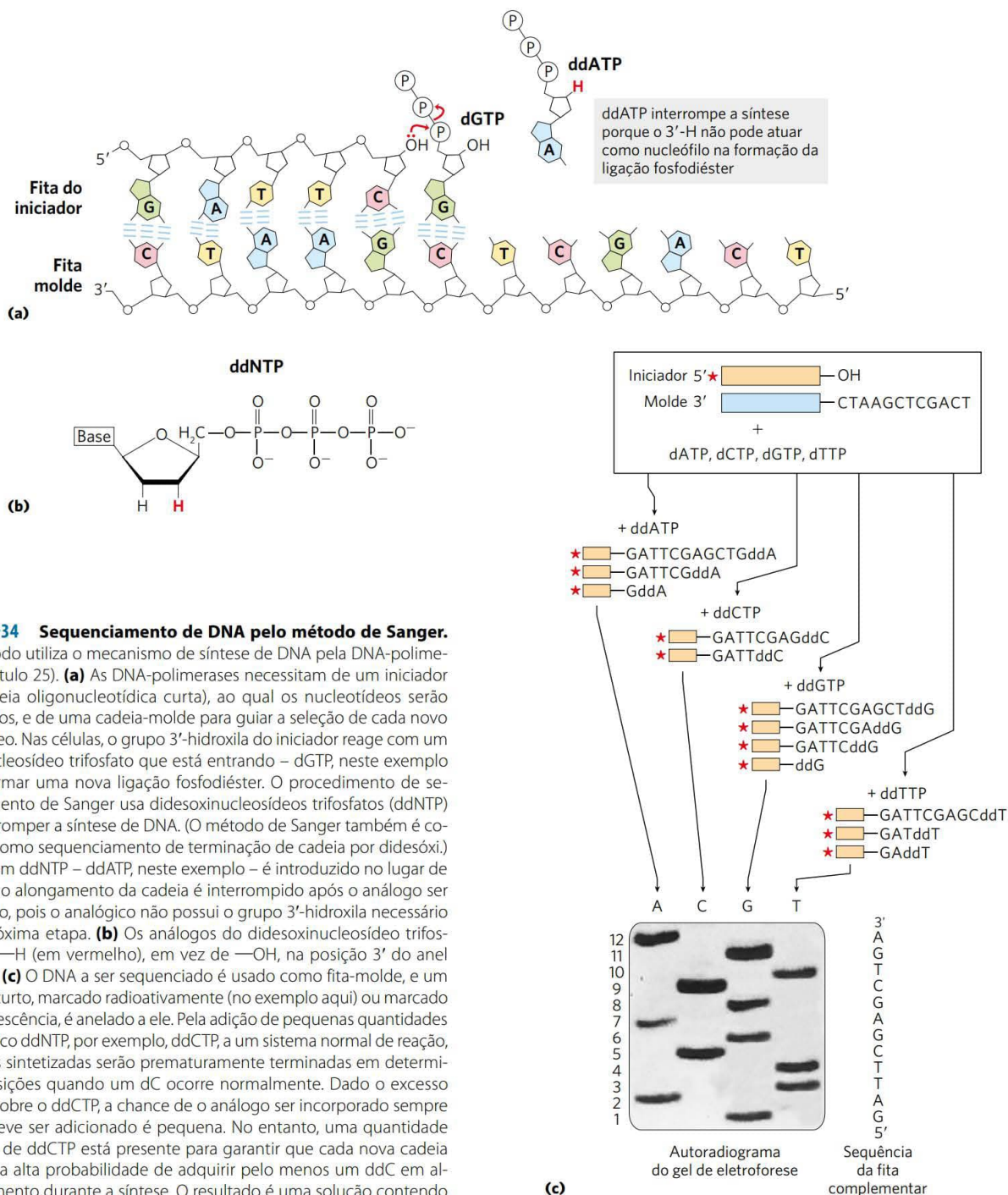


FIGURA 8-34 Sequenciamento de DNA pelo método de Sanger.

Esse método utiliza o mecanismo de síntese de DNA pela DNA-polimerase (Capítulo 25). **(a)** As DNA-polimerases necessitam de um iniciador (uma cadeia oligonucleotídica curta), ao qual os nucleotídeos serão adicionados, e de uma cadeia-molde para guiar a seleção de cada novo nucleotídeo. Nas células, o grupo 3'-hidroxila do iniciador reage com um desoxinucleosídeo trifosfato que está entrando – dGTP, neste exemplo – para formar uma nova ligação fosfodiéster. O procedimento de sequenciamento de Sanger usa didesoxinucleosídeos trifosfatos (ddNTP) para interromper a síntese de DNA. (O método de Sanger também é conhecido como sequenciamento de terminação de cadeia por didesoxi.) Quando um ddNTP – ddATP, neste exemplo – é introduzido no lugar de um dNTP, o alongamento da cadeia é interrompido após o análogo ser adicionado, pois o análogo não possui o grupo 3'-hidroxila necessário para a próxima etapa. **(b)** Os análogos do didesoxinucleosídeo trifosfato têm —H (em vermelho), em vez de —OH, na posição 3' do anel da ribose. **(c)** O DNA a ser sequenciado é usado como fita-molde, e um iniciador curto, marcado radioativamente (no exemplo aqui) ou marcado com fluorescência, é anelado a ele. Pela adição de pequenas quantidades de um único ddNTP, por exemplo, ddCTP, a um sistema normal de reação, as cadeias sintetizadas serão prematuramente terminadas em determinadas posições quando um dC ocorre normalmente. Dado o excesso de dCTP sobre o ddCTP, a chance de o análogo ser incorporado sempre que dC deve ser adicionado é pequena. No entanto, uma quantidade suficiente de ddCTP está presente para garantir que cada nova cadeia tenha uma alta probabilidade de adquirir pelo menos um ddC em algum momento durante a síntese. O resultado é uma solução contendo uma mistura de fragmentos marcados, cada um deles terminando com um resíduo de C. Cada resíduo de C na sequência produz um grupo de fragmentos de um tamanho específico, de modo que os fragmentos de tamanhos diferentes, separados por eletroforese, demonstram a localização do resíduo de C. Esse procedimento é repetido separadamente para cada um dos quatro ddNTP, e a sequência pode ser lida diretamente do autorradiograma do gel. Como pequenos fragmentos de DNA migram mais rapidamente, os fragmentos próximos à parte inferior do gel representam as posições dos nucleotídeos mais próximas do iniciador (a extremidade 5'), e a sequência é lida (na direção 5'→3') da parte inferior para a parte superior. Observe que a sequência obtida é aquela da cadeia complementar à cadeia que está sendo analisada. [Fonte: (c) Dr. Lloyd Smith, University of Wisconsin-Madison, Department of Chemistry.]

de DNA gerados durante as reações de síntese de DNA. A sequência da cadeia de DNA sintetizada foi lida diretamente a partir de um autorradiograma do gel resultante (Figura 8-34c). Como pequenos fragmentos de DNA migram mais rapidamente, os fragmentos próximos à parte inferior do gel representam as posições dos nucleotídeos mais próximas do iniciador (a extremidade 5') e a sequência é lida (na direção 5'→3') da parte inferior para a parte superior.

O sequenciamento de DNA foi primeiramente automatizado por uma variação do método de Sanger, no qual cada

QUADRO 8-1 Uma arma potente em medicina forense

Um dos métodos mais precisos para a colocação de um indivíduo na cena de um crime é a impressão digital. No entanto, o advento da tecnologia de DNA recombinante (ver Capítulo 9) disponibilizou uma ferramenta muito mais poderosa: a **genotipagem de DNA** (também conhecida como impressões digitais do DNA ou perfil de DNA). Como descrito pela primeira vez pelo geneticista inglês Alec Jeffreys, em 1985, o método está baseado em **polimorfismos de sequência**, pequenas diferenças de sequência entre os indivíduos: 1 em cada 1.000 pares de bases (pb), em média. Cada diferença do protótipo da sequência do genoma humano (o primeiro genoma humano que foi sequenciado) ocorre em alguma fração da população humana; cada pessoa tem algumas diferenças deste protótipo.

O trabalho forense moderno concentra-se em diferenças nos comprimentos das sequências de **repetições curtas em tandem (STR)**, do inglês, *short tandem repeat*). Um *locus* STR é uma localização específica em um cromossomo, onde uma sequência curta de DNA (geralmente

com 4 pb de comprimento) está repetida várias vezes em tandem. Os *loci* mais frequentemente utilizados na genotipagem de STR são curtos, 4 a 50 repetições (16 a 200 pb para repetições de tetranucleotídeos), e têm muitos variantes de comprimento na população humana. Mais de 20.000 *loci* de STR de tetranucleotídeos foram caracterizados no genoma humano, e mais de 1 milhão de STR de todos os tipos podem estar presentes no genoma humano, representando cerca de 3% de todo o DNA humano.

O comprimento de uma STR específica em um indivíduo pode ser determinado com o auxílio da reação em cadeia da polimerase (ver Figura 8-33). O uso de PCR também torna o procedimento suficientemente sensível para ser aplicado a quantidades muito pequenas de amostras de DNA, recolhidas muitas vezes em cenas de crime. As sequências de DNA que acompanham as STR são exclusivas para cada *locus* STR e idênticas (exceto para mutações extremamente raras) em todos os seres humanos. Os oligonucleotídeos iniciadores da PCR são direcionados para esse DNA que acompanha a STR e são

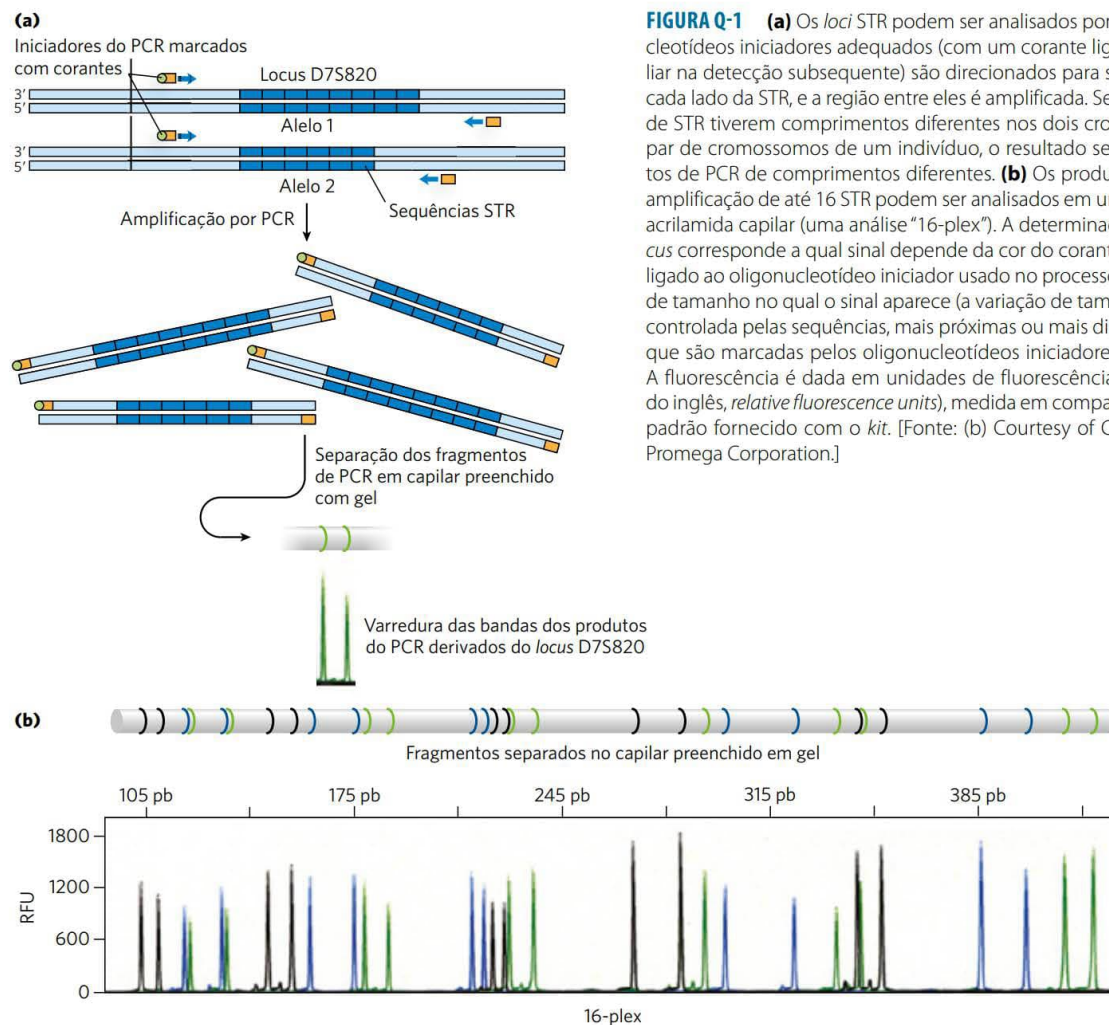


FIGURA Q-1 (a) Os *loci* STR podem ser analisados por PCR. Oligonucleotídeos iniciadores adequados (com um corante ligado para auxiliar na detecção subsequente) são direcionados para sequências em cada lado da STR, e a região entre eles é amplificada. Se as sequências de STR tiverem comprimentos diferentes nos dois cromossomos do par de cromossomos de um indivíduo, o resultado será dois produtos de PCR de comprimentos diferentes. (b) Os produtos de PCR da amplificação de até 16 STR podem ser analisados em um único gel de acrilamida capilar (uma análise "16-plex"). A determinação de qual *locus* corresponde a qual sinal depende da cor do corante fluorescente ligado ao oligonucleotídeo iniciador usado no processo e da variação de tamanho no qual o sinal aparece (a variação de tamanho pode ser controlada pelas sequências, mais próximas ou mais distantes da STR, que são marcadas pelos oligonucleotídeos iniciadores designados). A fluorescência é dada em unidades de fluorescência relativa (RFU, do inglês, *relative fluorescence units*), medida em comparação com um padrão fornecido com o *kit*. [Fonte: (b) Courtesy of Carol Bingham, Promega Corporation.]

desenhados para amplificar o DNA ao longo da STR (Figura Q-1a). O comprimento do produto da PCR, portanto, reflete o comprimento da STR nessa amostra. Como cada ser humano herda um cromossomo de cada par de cromossomos de cada progenitor, os comprimentos de STR nos dois cromossomos são frequentemente diferentes, gerando dois comprimentos de STR diferentes a partir de um indivíduo. Os produtos de PCR são submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida em um tubo capilar muito fino. As bandas resultantes são convertidas em um conjunto de picos que revelam com precisão o tamanho de cada fragmento de PCR e, assim, o comprimento da STR no alelo correspondente. A análise de múltiplos *loci* STR pode produzir um perfil exclusivo para um indivíduo (Figura Q-1b). Isso normalmente é realizado com um *kit* disponível comercialmente, que inclui oligonucleotídeos iniciadores de PCR únicos para cada *locus*, ligados a corantes coloridos para ajudar a distinguir os diferentes produtos de PCR. A amplificação por PCR permite aos investigadores obter genótipos de STR de menos de 1 ng de DNA parcialmente degradado, quantidade que pode ser obtida a partir de um único folículo piloso, uma gota de sangue, uma pequena amostra de sêmen ou amostras com meses ou até mesmo vários anos de idade. Quando bons genótipos de STR são obtidos, a possibilidade de erros de identificação é inferior a 1 em 10^{18} .

O uso da análise de STR necessitou de padronização, conseguida pela primeira vez no Reino Unido, em 1995.

O padrão dos Estados Unidos, Combined DNA Index System (CODIS, sistema combinado do índice do DNA), criado em 1998, baseia-se em 13 *loci* STR bem estudados, que devem estar presentes em qualquer experimento de tipagem de DNA realizado nos Estados Unidos (Tabela Q-1). O gene amelogenina também é utilizado como marcador nas análises. Presente em cromossomos sexuais humanos, esse gene tem um comprimento um pouco diferente nos cromossomos X e Y. Assim, a amplificação por PCR por meio desse gene gera produtos de diferentes tamanhos que revelam o sexo do doador de DNA. Em meados de 2015, o banco de dados do CODIS continha mais de 14 milhões de genótipos de STR e havia auxiliado em mais de 274 mil investigações forenses.

A genotipagem de DNA é utilizada tanto para condenar como para absolver suspeitos e para estabelecer a paternidade com um extraordinário grau de certeza. Nos Estados Unidos, houve pelo menos 330 revogações de condenações baseadas em evidências de DNA. O impacto desses procedimentos em casos jurídicos continuará a crescer à medida que os padrões forem aprimorados e os bancos de dados internacionais de genotipagem STR aumentarem. Mesmo casos misteriosos muito antigos poderão ser resolvidos. Em 1996, a genotipagem do STR ajudou a confirmar a identificação dos ossos do último czar russo e de sua família, que foram assassinados em 1918.

TABELA Q-1 Propriedades dos loci utilizados para o banco de dados CODIS

Locus	Cromossomo	Motivo de repetição	Comprimento da repetição (faixa) ^a	Número de alelos observados ^b
CSF1PO	5	TAGA	5-16	20
FGA	4	CTTT	12,2-51,2	80
TH01	11	TCAT	3-14	20
TPOX	2	GAAT	4-16	15
VWA	12	[TCTG][TCTA]	10-25	28
D3S1358	3	[TCTG][TCTA]	8-21	24
D5S818	5	AGAT	7-18	15
D7S820	7	GATA	5-16	30
D8S1179	8	[TCTA][TCTG]	7-20	17
D13S317	13	TATC	5-16	17
D16S539	16	GATA	5-16	19
D18S51	18	AGAA	7-39,2	51
D21S11	21	[TCTA][TCTG]	12-41,2	82
Amelogenina ^c	X, Y	Não aplicado		

Fonte: dados de J. M. Butler, *Forensic DNA Typing*, 2ª ed., Elsevier, 2005, p. 96.

^aComprimentos repetidos observados na população humana. As repetições parciais ou imperfeitas podem ser incluídas em alguns alelos.

^bNúmero de diferentes alelos observados desde 2005 na população humana. A análise cuidadosa de um *locus* em vários indivíduos é um pré-requisito para o seu uso na tipagem forense do DNA.

^cA amelogenina é um gene, com tamanho levemente diferente nos cromossomos X e Y, utilizado para estabelecer o gênero.

um dos quatro ddNTP usados para uma reação foi marcado com um composto fluorescente de cor diferente (**Figura 8-35**). Com essa tecnologia, todos os quatro ddNTP poderiam ser introduzidos em uma única reação. Os pesquisadores puderam sequenciar moléculas de DNA contendo milhares de nucleotídeos em poucas horas, e todos os genomas de centenas de organismos foram sequenciados dessa maneira. Por exemplo, no Projeto Genoma Humano, os pesquisadores sequenciaram todos os $3,2 \times 10^9$ pares de bases (pb) do DNA em uma célula humana (ver Capítulo 9) em um esforço que durou quase uma década e incluiu contribuições de dezenas de laboratórios em todo o mundo. Essa forma de sequenciamento de Sanger ainda é utilizada para análises de rotina de segmentos curtos de DNA.

Tecnologias de sequenciamento de DNA estão avançando rapidamente

As **tecnologias de sequenciamento de DNA** continuam a evoluir. Um genoma humano completo pode, agora, ser sequenciado em um ou dois dias, e um genoma bacteriano, em poucas horas. Uma sequência genômica pessoal pode ser incluída rotineiramente no prontuário de cada indivíduo, a um custo modesto. Esses avanços se tornaram possíveis por meio de métodos chamados de sequenciamento de última geração, ou “nextgen”. As estratégias de sequenciamento são, às vezes, semelhantes e, outras vezes, bastante diferentes das usadas no método de Sanger. As inovações permitiram uma miniaturização do procedimento, um grande aumento na escala e uma diminuição correspondente no custo.

Uma sequência genômica é determinada em várias etapas. Primeiro, o DNA genômico a ser sequenciado é fragmentado em locais aleatórios para gerar fragmentos de algumas centenas de pares de bases de comprimento. Oligonucleotídeos sintéticos de sequência conhecida são ligados a cada extremidade de todos os fragmentos, proporcionando um ponto de referência em cada molécula de DNA. Os fragmentos individuais são, então, imobilizados numa superfície sólida e cada um é amplificado no local por PCR para formar um *cluster* estanque de fragmentos idênticos. A superfície sólida é parte de um canal que permite que as soluções líquidas possam fluir sobre as amostras. O resultado é uma superfície sólida de apenas alguns centímetros de largura com milhões de *clusters* de DNA ligados nessa superfície, cada *cluster* contendo muitas cópias de uma única sequência de DNA derivada de um fragmento de DNA

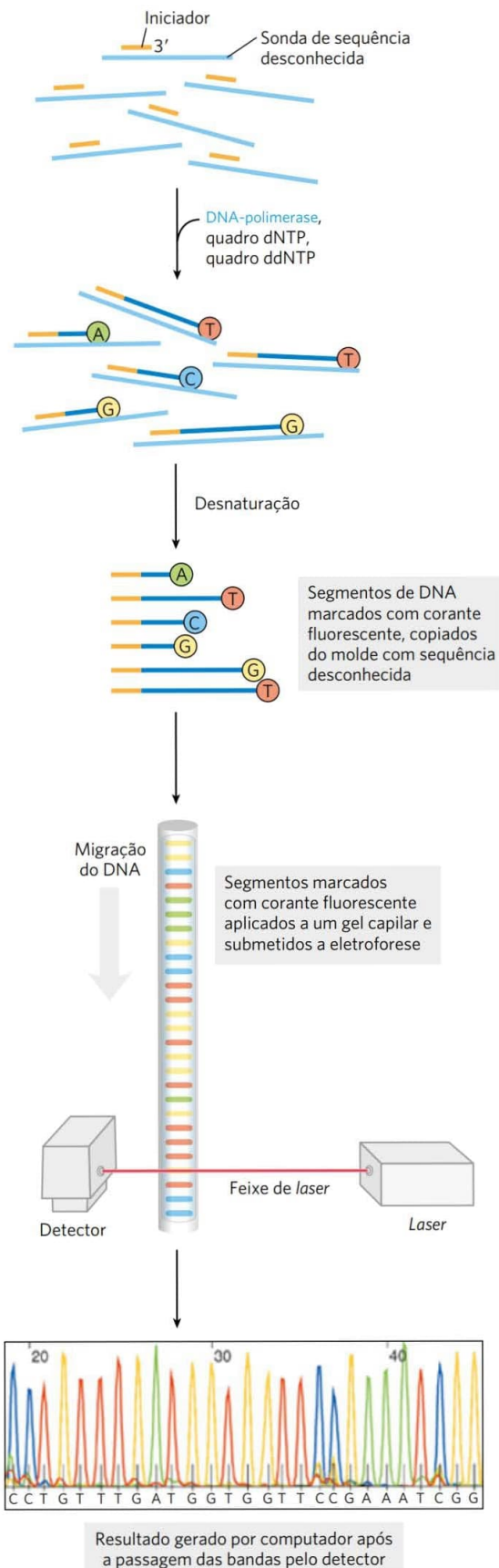
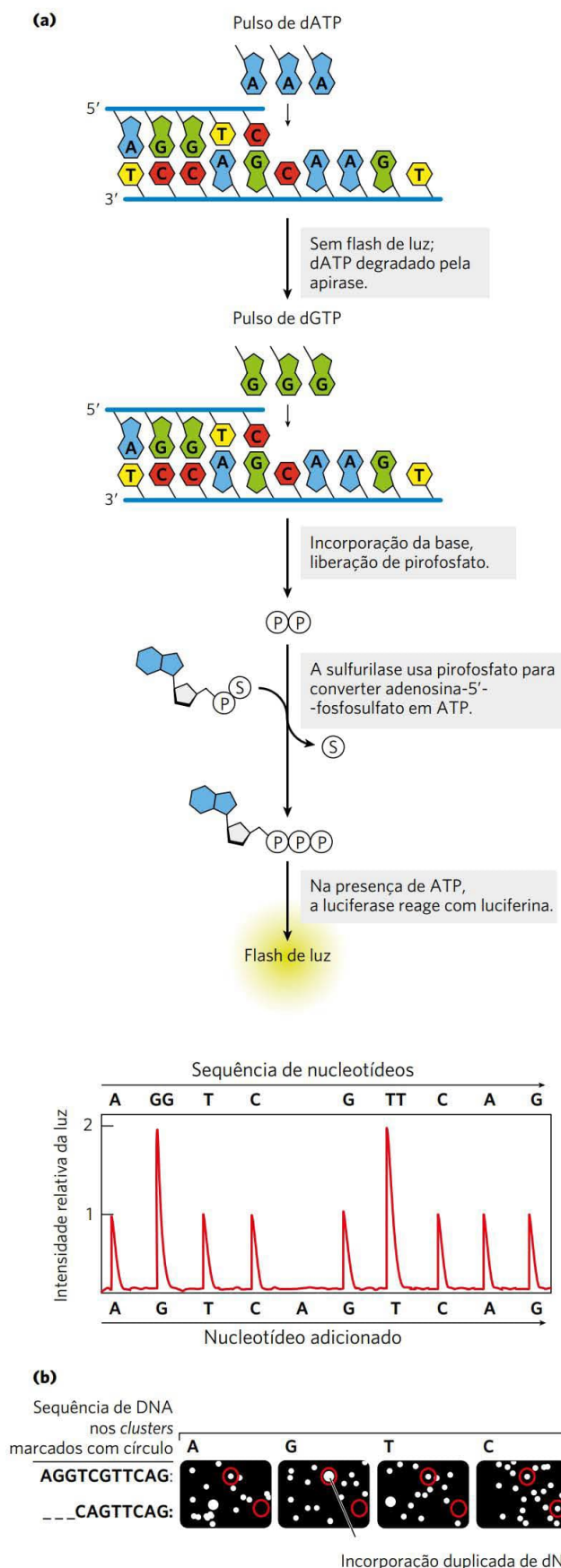


FIGURA 8-35 Automação das reações de sequenciamento de DNA.

No método de Sanger, cada ddNTP pode ser ligado a uma molécula fluorescente (corante) que dá a mesma cor a todos os fragmentos que terminam naquele nucleotídeo, com uma cor diferente para cada nucleotídeo. Todos os quatro ddNTP marcados são adicionados à mistura de reação juntos. Os fragmentos de DNA coloridos resultantes são separados por tamanho em um gel de eletroforese em um tubo capilar (um refinamento de eletroforese em gel que permite separações mais rápidas). Todos os fragmentos de um determinado comprimento migram através do gel do tubo capilar juntos em uma única banda, e a cor associada a cada banda é detectada com um feixe de *laser*. A sequência de DNA é lida identificando as sequências de cores nas bandas à medida que elas passam pelo detector, fornecendo essas informações diretamente para um computador. A quantidade de fluorescência em cada banda é representada como um pico na saída do computador. [Fonte: dados fornecidos por Lloyd Smith, University of Wisconsin-Madison, Department of Chemistry.]



genômico aleatório. A eficiência do sequenciamento de última geração vem do sequenciamento de todos esses milhões de *clusters* ao mesmo tempo, com os dados de cada *cluster* capturados e armazenados em um computador.

Dois métodos de última geração amplamente utilizados empregam diferentes estratégias para realizar as reações de sequenciamento. Em ambos os casos, a sequência que se obtém é a de uma cadeia de DNA recém-sintetizada, complementar às fitas-molde de DNA que estão sendo analisadas. Um dos métodos, conhecido como sequenciamento 454 (os números referem-se a um código usado durante o desenvolvimento da tecnologia e não têm significado científico), usa uma estratégia chamada de **pirossequenciamento**, na qual a adição de nucleotídeos é detectada por *flashes* de luz (Figura 8-36). Os quatro dNTP (inalterados) são adicionados à superfície de reação, um de cada vez, em uma sequência repetitiva. A solução de nucleotídeos é retida na superfície apenas o tempo suficiente para que a DNA-polimerase (uma das várias enzimas presentes no meio que banha a superfície) adicione esse nucleotídeo a qualquer *cluster*, onde ele é complementar ao próximo nucleotídeo na sequência-molde. O excesso de nucleotídeos é destruído rapidamente pela enzima apirase antes que o próximo nucleotídeo seja adicionado. Quando um nucleotídeo específico é adicionado com sucesso às cadeias de um agrupamento, o pirofosfato é liberado como um subproduto. A enzima sulfúrilase usa o pirofosfato para transformar a adenosina 5'-fosfosulfato do meio em ATP. O aparecimento do ATP fornece o sinal de que um nucleotídeo foi adicionado ao DNA. Também no meio de reação estão a enzima luciferase e seu substrato, luciferina. Quando o ATP é gerado, a luciferase catalisa uma reação com luciferina que emite um pequeno *flash* de luz. (Essa reação dá aos vaga-lumes o seu *flash*; ver Quadro 13-1.) Quando muitos *flashes* pequenos ocorrem em um grupo, a luz emitida pode ser gravada em uma imagem capturada. Por exemplo, quando o dCTP é adicionado à solução, os *flashes* ocorrem apenas em *clusters* onde G é a próxima base no molde, e C é o próximo nucleotídeo a ser adicionado à cadeia de DNA em crescimento. Se houver uma sequência de dois, três ou quatro resíduos

FIGURA 8-36 Pirossequenciamento de última geração. (a) O pirossequenciamento usa *flashes* de luz para detectar a adição de nucleotídeos complementares no DNA (molde) a serem sequenciados. Cada segmento individual de DNA a ser sequenciado é ligado a um microgrânulo de captura de DNA e, em seguida, amplificado no grânulo por PCR. Cada grânulo é imerso em uma emulsão e colocado em um micropoço (~ 29 µm de diâmetro) em uma placa de microtitulação. A reação de luciferina e do ATP com a luciferase produz *flashes* de luz quando um nucleotídeo é adicionado a um grupo de DNA específico em um determinado poço. (b) A representação artística de uma parte muito pequena de um ciclo de uma sequência de sequenciamento 454. Cada mancha branca representa um único *cluster* de fragmentos de DNA, com os mesmos *clusters* mostrados ao longo de vários ciclos. Neste exemplo, a leitura do ponto circular superior (ou inferior) da esquerda para a direita em cada linha fornece a sequência desse *cluster*.

G no molde, um número correspondente de resíduos C será adicionado à cadeia em crescimento em um ciclo. Isso é registrado como uma amplitude do “flash” no *cluster*, que é duas, três ou quatro vezes maior do que quando apenas um resíduo C é adicionado. Da mesma forma, quando o dGTP é adicionado, os *flashes* ocorrem em um conjunto diferente de *clusters*, marcando-os como *clusters* em que G é o próximo nucleotídeo adicionado à sequência (onde C está presente no molde).

O comprimento do DNA que pode ser sequenciado de forma confiável em um único *cluster* por esse método, geralmente chamado de comprimento de leitura ou “leitura”, é comumente de 400 a 500 nucleotídeos e está aumentando rapidamente.

O segundo método de sequenciamento de última geração amplamente utilizado emprega uma técnica conhecida como **sequenciamento de terminação reversível** (Figura 8-37), que está no coração do sequenciador da

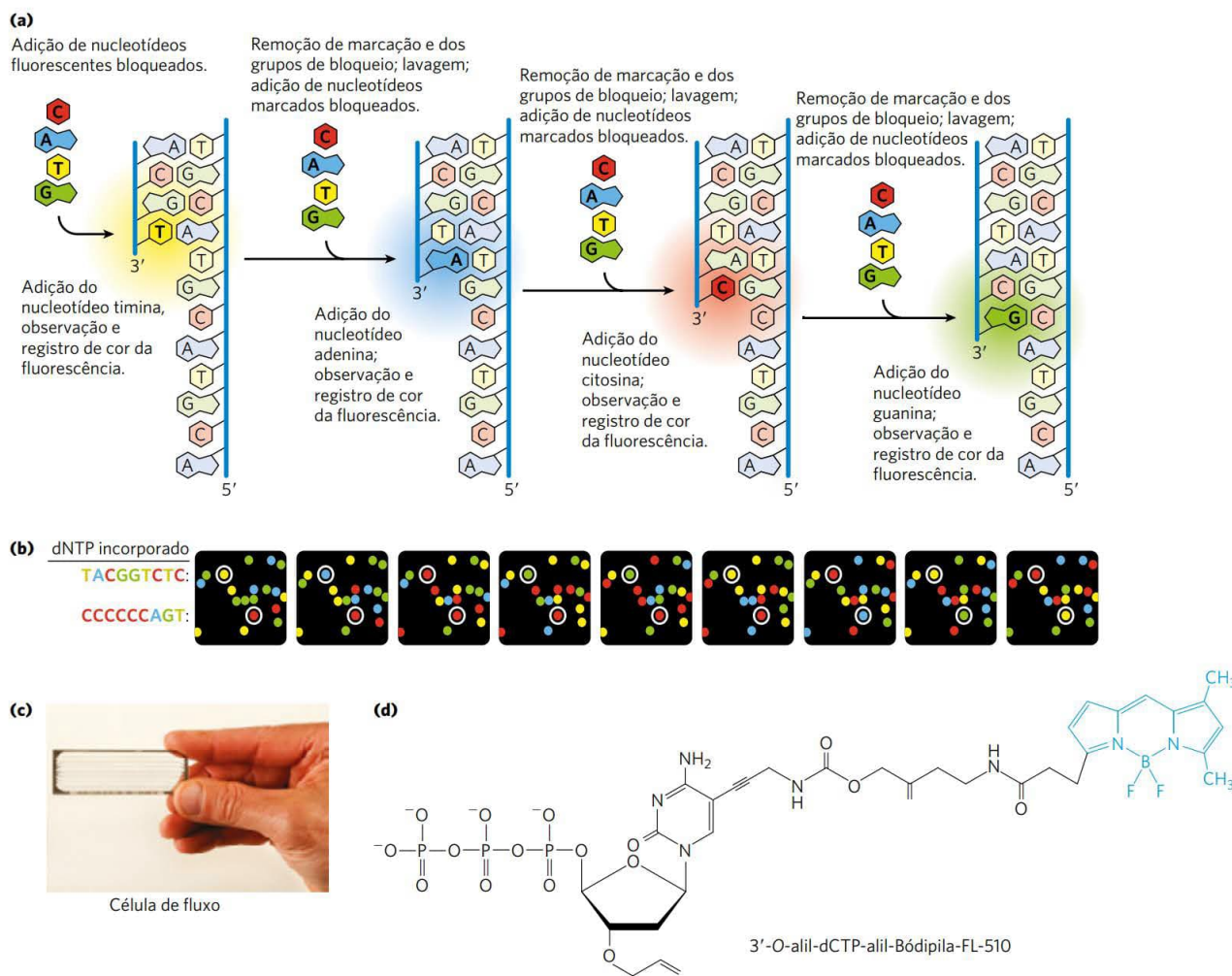


FIGURA 8-37 Sequenciamento de terminação reversível de última geração. (a) O método de terminação reversível utiliza marcadores fluorescentes para identificar nucleotídeos. Grupos de bloqueio em cada nucleotídeo marcado com fluorescência evitam que mais de um nucleotídeo sejam adicionados em um único ciclo. (b) Interpretação artística de nove ciclos sucessivos de uma parte muito pequena de uma sequência de sequenciamento por Illumina. Cada ponto colorido representa a localização de um grupo de oligonucleotídeos idênticos imobilizados e fixos à superfície da célula de fluxo. Os círculos brancos representam os mesmos dois grupos na superfície ao longo de ciclos sucessivos, com as sequências indicadas. Os dados são gravados e analisados digitalmente. (c) Célula de fluxo típica, utilizada para um sequenciador de última geração. Milhões de fragmentos de DNA podem ser sequenciados simultaneamente em cada um dos oito canais. (d) Um desoxirribonucleotídeo, neste caso, dCTP, modificado para utilização no sequenciamento de terminação reversível. A base é modificada de modo a ter uma cor fluorescente, e a posição 3' é bloqueada quimicamente. Tanto o corante quanto o grupo de bloqueio da extremidade 3' podem ser removidos, quimica ou fotoliticamente, deixando um grupo 3'-OH livre para a adição do próximo nucleotídeo. Os nucleotídeos modificados usados atualmente no sequenciamento de terminação reversível têm os direitos protegidos. (e) Parte da superfície de um canal durante uma reação de sequenciamento. [Fonte: (c) cortesia de Michael Cox Lab. (e) Cortesia de Illumina, Inc.]

Illumina. Uma vez que as sequências genômicas são fragmentadas e os oligonucleotídeos de sequência conhecida estão ligados nas extremidades, os segmentos de DNA são imobilizados em uma superfície sólida e amplificados no local por PCR. Um iniciador de sequenciamento especial é, então, adicionado, o qual é complementar aos oligonucleotídeos de sequência conhecida nas extremidades do segmento. Quatro diferentes desoxinucleotídeos modificados (A, T, G e C), cada um com um marcador fluorescente específico que identifica o nucleotídeo por cor, são adicionados, juntamente com a DNA-polimerase. Os nucleotídeos marcados são nucleotídeos terminadores especiais com grupos bloqueadores ligados às suas extremidades 3' que permitem que apenas um nucleotídeo seja adicionado a cada cadeia. A polimerase adiciona o nucleotídeo apropriado às cadeias em cada *cluster*. Em seguida, raios *laser* excitam todos os marcadores fluorescentes, e uma imagem de toda a superfície

revela a cor (e, portanto, a identidade da base) adicionada a cada grupo. O marcador fluorescente e os grupos de bloqueio são, então, removidos quimicamente ou fotoliticamente, em preparação para a adição de um novo nucleotídeo para cada grupo. Os procedimentos de sequenciamento são realizados em etapas. Os comprimentos de leitura são mais curtos para esse método, geralmente 100 a 200 nucleotídeos por *cluster*, embora os refinamentos continuem.

Utilizando-se esses métodos cada vez mais poderosos, determinar a sequência genômica completa de um organismo é muito mais rápido e barato. Algumas centenas de pares de bases de uma sequência podem ter pouco valor, a menos que se saiba onde, em um cromossomo, a sequência está localizada. Traduzir as sequências de milhões de fragmentos curtos de DNA em uma sequência genômica complexa e contígua requer o alinhamento computadorizado de fragmentos sobrepostos (**Figura 8-38**). O número de vezes que

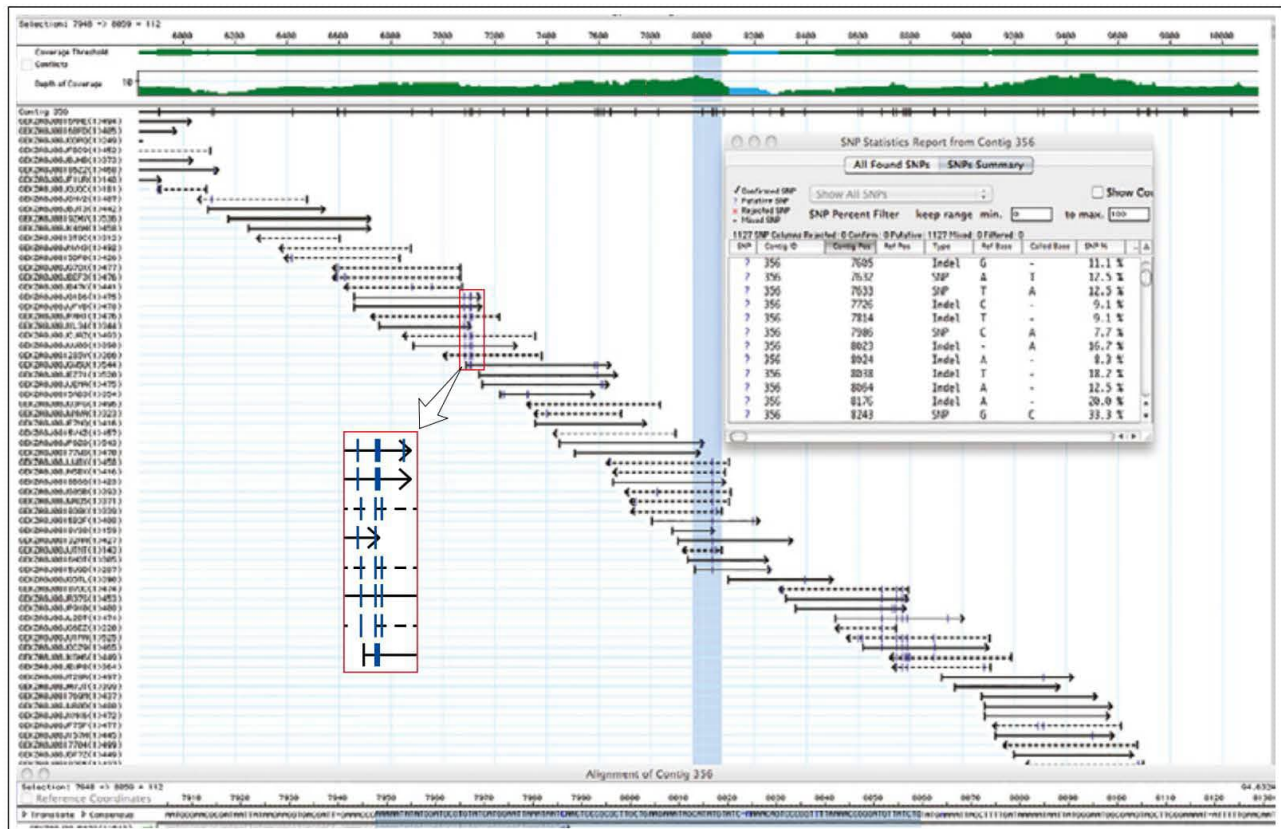


FIGURA 8-38 Montagem da sequência. Numa sequência genômica, cada par de bases do genoma é comumente representado em muitos fragmentos sequenciados, designados como leituras. Nessa figura, é mostrada uma pequena parte da sequência de uma nova variante de espécie de *E. coli*, com as leituras geradas por um sequenciador 454. Os números no topo representam as posições de pares de bases no genoma, em relação a um ponto de referência definido arbitrariamente. Todos as sequências provêm de um contig longo específico, designado 356. As leituras estão representadas por setas horizontais, com identificadores atribuídos por computador para cada leitura listada à esquerda. Os segmentos de fita de DNA são sequenciados aleatoriamente, com sequências obtidas de uma fita (5' para 3', da esquerda para a direita) representada por setas e sequências sólidas obtidas da outra fita (5' para 3', da direita para a esquerda) representada por setas tracejadas (estas últimas automaticamente relatadas como seu complemento quando são mescladas com o conjunto de dados geral). O "limiar de cobertura" na parte superior é uma medida da qualidade da sequência. A barra verde mais larga indica sequências que foram obtidas em quantidades suficientes para gerar alta confiança nos resultados; a profundidade da linha de cobertura indica quantas vezes um determinado par de bases aparece em uma leitura de sequência. A barra vertical azul-sombreada indica uma parte da sequência destacada na linha de sequência na parte inferior da figura. O "relatório de estatísticas de SNP" (inseto) é uma listagem de posições nas quais alterações de sequência, denominadas polimorfismos de nucleotídeo único (SNP; ver Capítulo 9), parecem estar presentes em algumas das leituras. Esses supostos SNP são, muitas vezes, verificados por sequenciamento adicional. Eles são indicados nas leituras por marcas verticais finas azuis nas linhas horizontais de cada leitura.

um determinado nucleotídeo em um genoma é sequenciado, em média, é referido como **profundidade do sequenciamento** ou cobertura do sequenciamento. Na maioria dos casos, um número suficientemente grande de fragmentos aleatórios é sequenciado para que cada nucleotídeo no genoma seja sequenciado em uma média de 30 a 40 vezes (cobertura de 30-40×). Embora a cobertura de determinados nucleotídeos possa variar (alguns serão sequenciados 100 vezes, talvez alguns poucos não serão sequenciados), esse nível de cobertura garante que a maioria dos nucleotídeos genômicos seja sequenciada pelo menos 10 vezes e que a maioria dos erros de sequenciamento seja detectada e eliminada. As sobreposições permitem que o computador trace a sequência através de um cromossomo, de um fragmento sobreposto a outro, permitindo a montagem de sequências longas e contíguas, chamadas de **contigs**. Em um exercício de sequenciamento genômico bem-sucedido, muitos contigs podem se estender por milhões de pares de bases. São necessárias estratégias especiais para preencher as lacunas inevitáveis e para lidar com as sequências repetitivas.

Para algumas aplicações, a profundidade de sequenciamento é aumentada para 100× ou mesmo 1.000× pelo sequenciamento de quantidades muito maiores de DNA genômico. Essa abordagem, às vezes chamada de **sequenciamento profundo**, pode ajudar a determinar se uma mutação ou outra variação genômica está presente em um subconjunto de células de um organismo. O sequenciamento profundo também é útil na caracterização de sequências genômicas em tumores cancerígenos, os quais têm genomas altamente instáveis, com frequentes alterações de sequência à medida que o tumor cresce.

As tecnologias de sequenciamento de DNA continuam avançando rapidamente, e alguns métodos mais recentes de última geração complementam os dois descritos acima, e podem, eventualmente, substituí-los em muitas aplicações. Por exemplo, um método chamado de **sequenciamento por semicondutor de íons** (no coração de um método com o nome comercial de Ion Torrent) usa fragmentos de DNA imobilizados, muito parecido com o sequenciamento do 454 e da Illumina. Os quatro dNTP são introduzidos um a um em um ciclo de repetição, cada um sendo removido antes que o próximo seja adicionado. A adição de um determinado dNTP em um determinado ponto na cadeia crescente é detectada pela medida dos prótons liberados na reação. Outra abordagem, chamada de **sequenciamento em tempo real de molécula única (SMRT)**, do inglês, *single-molecule real-time*, foi possível graças à invenção de métodos de detecção de luz cada vez mais sensíveis. Uma única molécula de DNA-polimerase é imobilizada no fundo de cada um dos milhões de poros precisamente projetados na célula de fluxo. A polimerase captura segmentos genômicos fragmentados à medida que se difundem no poro. Os dNTP marcados então se difundem, com cada nucleotídeo recém-adicionado liberando seu grupo fluorescente colorido à medida que se liga à cadeia de DNA. Um sistema de detecção de luz inovador registra a cor da luz resultante na parte inferior do poro, revelando a identidade de cada nucleotídeo adicionado. O método é preciso e pode gerar comprimentos de leitura particularmente longos, até quase 10 mil pares de bases.

RESUMO 8.3 Química dos ácidos nucleicos

- O DNA nativo passa por desenrolamento reversível e separação de cadeias (fusão) sob aquecimento ou em pH extremos. Os DNA ricos em pares G≡C têm ponto de fusão maior do que os DNAs ricos em pares A=T.
- O DNA é um polímero relativamente estável. Reações espontâneas, como a desaminação de certas bases, a hidrólise da ligação *N*-glicosídica base-açúcar, a formação de dímeros de pirimidina induzida por radiação e o dano oxidativo, ocorrem em taxas muito baixas, mas são importantes devido à tolerância muito baixa da célula a mudanças no material genético.
- Oligonucleotídeos de sequências conhecidas podem ser sintetizados rápida e acuradamente.
- A reação em cadeia da polimerase (PCR) proporciona um modo conveniente e rápido para amplificar segmentos de DNA se as sequências das extremidades do segmento do DNA-alvo forem conhecidas.
- O sequenciamento de DNA de genes ou de segmentos curtos de DNA de rotina é feito usando uma variação automatizada do sequenciamento didesóxi de Sanger.
- Sequências de DNA, incluindo genomas inteiros, podem ser eficientemente determinadas em horas ou dias com uma variedade de métodos, incluindo sequenciamento de última geração.

8.4 Outras funções dos nucleotídeos

Além das funções como subunidades dos ácidos nucleicos, os nucleotídeos têm um grande número de outras funções nas células: como carreadores de energia, componentes de cofatores enzimáticos e mensageiros químicos.

Os nucleotídeos carregam energia química nas células

O grupo fosfato ligado covalentemente na 5'-hidroxila de um ribonucleotídeo pode ter um ou dois fosfatos adicionais ligados. As moléculas resultantes são conhecidas como nucleosídeos mono, di e trifosfatos (**Figura 8-39**). Iniciando a partir da ribose, os três fosfatos são geralmente marcados como α , β e γ . A hidrólise de nucleosídeos trifosfatos produz a energia química para direcionar muitas reações celulares. A adenosina 5'-trifosfato, ATP, é sem dúvida a mais amplamente utilizada, porém UTP, GTP e CTP também são usados em algumas reações. Os nucleosídeos trifosfatos também servem como os precursores ativados na síntese de DNA e de RNA, como descrito nos Capítulos 25 e 26.

A estrutura do grupo trifosfato é responsável pela energia liberada durante a hidrólise do ATP e de outros nucleosídeos trifosfatos. A ligação entre a ribose e o fosfato α é uma ligação éster. As ligações α , β e γ são fosfoanídricas (**Figura 8-40**). A hidrólise de ligações éster rende cerca de 14 kJ/mol em condições-padrão, ao passo que a hidrólise de cada ligação anidrido produz cerca de 30 kJ/mol. A hidrólise do ATP muitas vezes exerce uma função termodinâmica importante na biossíntese. Quando acoplada a uma reação com variação de energia livre positiva, a hidrólise do ATP muda o equilíbrio do processo geral para favorecer a forma-

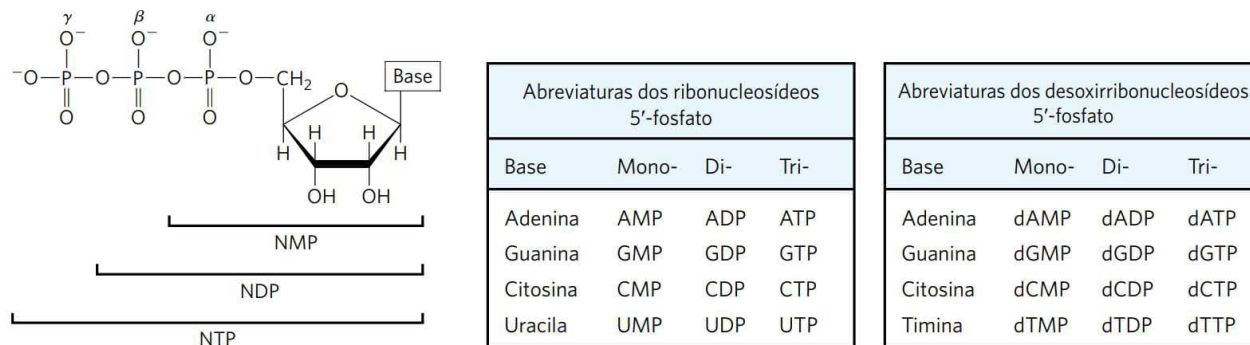


FIGURA 8-39 Nucleosídeos fosfatos. Estrutura geral dos nucleosídeos 5'-mono, di e trifosfatos (NMP, NDP e NTP) e suas abreviações-padrão. Nos didesoxirribonucleosídeos fosfatos (dNMP, dNDP e dNTP), a pentose é a 2'-desóxi-D-ribose.

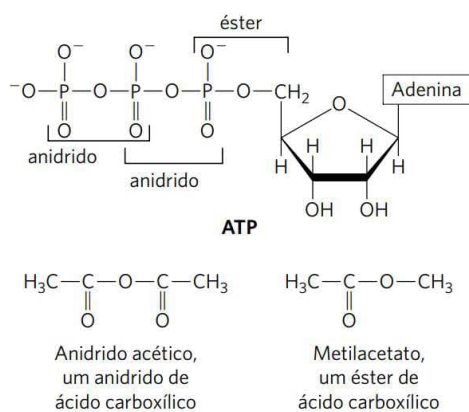


FIGURA 8-40 Ligações de éster de fosfato e fosfoanidrido do ATP. A hidrólise de uma ligação anidrido produz mais energia do que a hidrólise do éster. O anidrido de um ácido carboxílico e o éster de ácido carboxílico estão mostrados para comparação.

ção do produto (lembre-se da relação entre a constante de equilíbrio e a variação de energia livre descrita pela Equação 6-3, na p. 192).

Nucleotídeos da adenina são componentes de muitos cofatores enzimáticos

Uma série de cofatores enzimáticos que possui uma ampla gama de funções químicas inclui a adenosina como parte de suas estruturas (**Figura 8-41**). Eles não são estruturalmente relacionados, exceto pela presença de adenosina. Em nenhum desses cofatores a porção da adenosina participa diretamente da função principal, mas a sua remoção, em geral, resulta em uma redução drástica da atividade do cofator. Por exemplo, a remoção do nucleotídeo adenina (3'-fosfoadenosina-difosfato) da acetoacetil-CoA, a coenzima A derivada do acetoacetato, reduz sua reatividade como substrato para a β -cetoacil-CoA-transferase (enzima do metabolismo dos lipídeos) por um fator de 10^6 . Apesar de essa exigência por adenosina não ter sido investigada detalhadamente, ela deve envolver a energia de ligação entre a enzima e o substrato (ou cofator) que é usada na catálise e na estabilização do complexo enzima-substrato inicial (Capítulo 6). No caso da β -cetoacil-CoA-transferase,

a porção nucleotídica da coenzima A parece ser uma “alavanca” de ligação que ajuda a puxar o substrato (acetoacetil-CoA) para o sítio ativo. Funções semelhantes podem ser encontradas para a porção nucleotídica de outros cofatores nucleotídicos.

Por que a adenosina é usada nessas estruturas, em vez de outras moléculas grandes? A resposta, nesse caso, pode envolver uma forma de economia evolutiva. Certamente, a adenosina não é a única que contribui para a quantidade de energia potencial de ligação. A importância da adenosina provavelmente não está tanto em alguma característica química especial, mas na vantagem evolutiva de usar um composto para muitas funções. Uma vez que o ATP se tornou a fonte universal de energia química, foram desenvolvidos sistemas para sintetizar ATP em maior quantidade do que outros nucleotídeos. Por ser abundante, torna-se a escolha lógica para a incorporação em uma ampla variedade de estruturas. A economia se estende à estrutura da proteína. Um domínio proteico único que liga adenosina pode ser usado em enzimas diferentes. Esse domínio, denominado **cavidade de ligação de nucleotídeo**, é encontrado em muitas enzimas que ligam ATP e cofatores nucleotídicos.

Alguns nucleotídeos são moléculas reguladoras

As células respondem a seu ambiente por receberem avisos dos hormônios ou outros sinais químicos externos. A interação desses sinais químicos extracelulares (“primeiros mensageiros”) com receptores na superfície da célula muitas vezes leva à produção de **segundos mensageiros** dentro da célula, os quais, por sua vez, conduzem a mudanças adaptativas no interior da célula (Capítulo 12). Muitas vezes, o segundo mensageiro é um nucleotídeo (**Figura 8-42**). Um dos mais comuns é a **adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMP cíclico, ou cAMP)**, formado a partir de ATP em uma reação catalisada pela adenilil-ciclase, uma enzima associada à face interna da membrana plasmática. O AMP cíclico exerce funções reguladoras em todas as células fora do reino vegetal. A guanosina 3',5'-cíclica monofosfato (cGMP) também tem funções regulatórias em muitas células.

Outro nucleotídeo regulador, o ppGpp (**Figura 8-42**), é produzido em bactérias como resposta a uma redução na

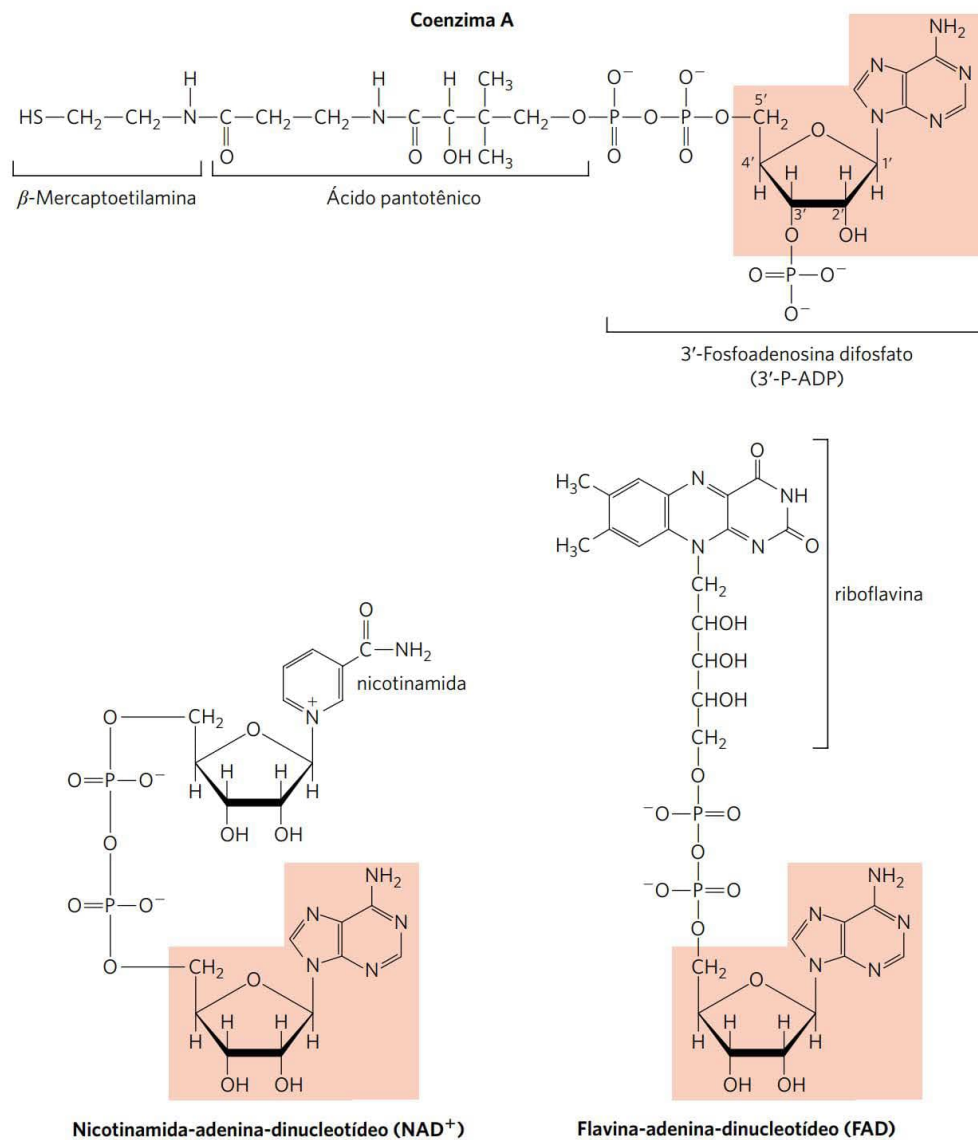


FIGURA 8-41 Algumas coenzimas que contêm adenosina. A porção adenosina está sombreada em cor salmão. A coenzima A (CoA) funciona em reações de transferência de grupos acila; o grupo acila (como o grupo acetila ou acetoacetila) é acoplado à CoA por meio de uma ligação tioéster à porção β -mercaptoetilamina. O NAD⁺ atua nas transferências de hidretos, e FAD, a forma ativa da vitamina B₂ (riboflavina), na transferência de elétrons. Outra coenzima que incorpora adenosina é a 5'-desoxiadenosilcobalamina, a forma ativa da vitamina B₁₂ (ver Quadro 17-2), a qual participa em transferências de grupos intramoleculares entre carbonos adjacentes.

velocidade da síntese proteica durante a falta de aminoácidos. Esse nucleotídeo inibe a síntese de moléculas de rRNA e tRNA (ver Figura 28-22) necessárias para a síntese proteica, prevenindo a produção desnecessária desses ácidos nucleicos.

Os nucleotídeos de adenina também servem como sinais

ATP e ADP também servem como moléculas sinalizadoras em muitos organismos unicelulares e multicelulares, incluindo os seres humanos. Em mamíferos, certos neurônios liberam ATP nas sinapses, que se ligam aos receptores P_{2Y} na célula pós-sináptica, desencadeando mudanças no po-

tencial de membrana ou a liberação de um segundo mensageiro intracelular que inicia diversos processos fisiológicos, incluindo sabor, inflamação e contração do músculo liso. Uma classe importante de receptores de ATP que medeiam a sensação de dor é um alvo óbvio para o desenvolvimento de medicamentos. O ADP extracelular é uma molécula de sinalização que age através de receptores P_{2Y} em tipos de células sensíveis. Ao impedir que o ADP se ligue aos receptores P_{2Y} das plaquetas, o fármaco clopidogrel (Plavix) inibe a coagulação sanguínea indesejável em pacientes com doença cardíaca. As vias de sinalização são discutidas em mais detalhes no Capítulo 12.

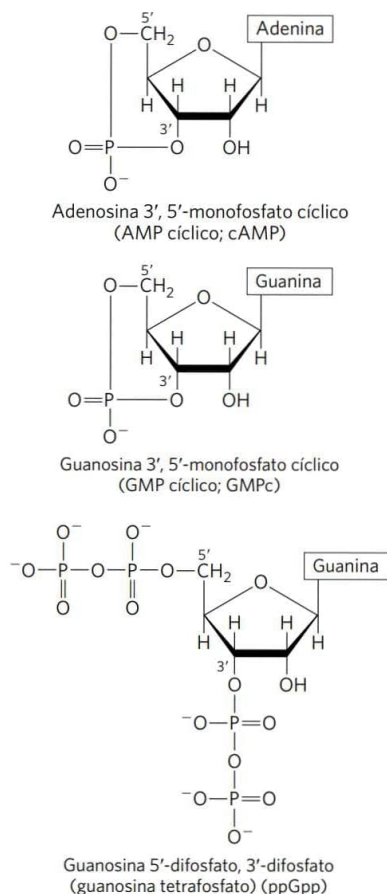


FIGURA 8-42 Três nucleotídeos reguladores.

RESUMO 8.4 Outras funções dos nucleotídeos

- O ATP é o carreador central de energia química nas células. A presença de uma porção adenosina em uma variedade de cofatores enzimáticos pode estar relacionada com as necessidades de energia de ligação.
- O AMP cíclico, formado a partir de ATP em uma reação catalisada pela adenilil-ciclase, é um segundo mensageiro comum, produzido em resposta a hormônios e outros sinais químicos.
- ATP e ADP servem como neurotransmissores em uma variedade de vias de sinalização.

Termos-chave

Termos em negrito estão definidos no glossário.

ácido desoxirribonucleico (DNA) 279	RNA mensageiro (mRNA) 279
ácido ribonucleico (RNA) 279	RNA transportador (tRNA) 279
gene 279	nucleotídeo 279
RNA ribossômico (rRNA) 279	nucleosídeo 279
	pirimidina 279

purina 279	DNA-polimerases 301
desoxirribonucleotídeo 281	sequenciamento de Sanger 302
ribonucleotídeo 282	polimorfismos de sequência 304
ligação fosfodiéster 283	repetições curtas em tandem (STR) 304
extremidade 5' 283	tecnologias de sequenciamento de DNA 306
extremidade 3' 283	pirosequenciamento 307
oligonucleotídeo 284	sequenciamento de terminação reversível 308
polinucleotídeo 284	profundidade do sequenciamento 310
par de bases 284	contig 310
sulco maior 286	sequenciamento por semicondutor de íons 310
sulco menor 286	sequenciamento em tempo real de molécula única (SMRT) 310
forma B do DNA 288	segundo mensageiro 311
forma A do DNA 288	adenosina 3',5'-cíclica monofosfato (AMP cíclico, cAMP) 312
forma Z do DNA 288	
palíndromo 289	
cruciforme 289	
grampo 289	
triplex de DNA 290	
tetraplex G 290	
transcrição 291	
mRNA	
monocistrônico 291	
mRNA policistrônico 291	
mutação 297	
reação em cadeia da polimerase (PCR) 301	

Teste seu conhecimento

1. Estrutura de nucleotídeos Quais posições no anel purínico dos nucleotídeos purínicos do DNA têm potencial para formar ligações de hidrogênio, mas não estão envolvidas no pareamento de bases de Watson-Crick?

2. Sequência de bases das fitas de DNA complementar Uma cadeia de um DNA de dupla-fita tem a sequência (5')GCGCAATATTTCTCAAAATATTGCGC(3'). Escreva a sequência de bases da fita complementar. Que tipo especial de sequência está contido nesse segmento de DNA? O DNA de cadeia dupla tem potencial para formar algumas estruturas alternativas?

3. DNA do corpo humano Calcule o peso em gramas de uma molécula de DNA de dupla-fita esticada da Terra até a Lua (~ 320.000 km). A dupla-hélice de DNA pesa em torno de 1×10^{-18} g por 1.000 pares de nucleotídeos; cada par de bases abrange 3,4 Å. Para uma comparação interessante, seu corpo contém aproximadamente 0,5 g de DNA.

4. Enovelamento do DNA Suponha que um segmento de poli(A) de cinco pares de bases produz um enovelamento de 20° em uma cadeia de DNA. Calcule o enovelamento total (líquido) produzido no DNA se o par de bases do centro (o terceiro dos cinco) de dois trechos (dA)₅ sucessivos estiver localizado (a) a uma distância de 10 pares de bases; (b) a uma distância de 15 pares de bases. Suponha 10 pares de bases por volta na dupla-hélice de DNA.

5. Distinção entre estrutura de DNA e estrutura de RNA Podem ser formados grampios na sequência palindrômica de cadeia única de ambos, RNA e DNA. Qual é a diferença entre estrutura helicoidal de um grampo longo e completamente pareado (exceto na extremidade) no RNA e um grampo semelhante no DNA?

6. Química de nucleotídeos As células de muitos organismos eucarióticos têm sistemas altamente especializados que reparam especificamente pareamentos incorretos G-T no DNA. O pareamento incorreto é reparado para formar o par de bases G=C (não A=T). Esse mecanismo de reparo do pareamento incorreto G-T ocorre além de um sistema mais geral que repara quase todos os pareamentos incorretos. Sugira por que as células necessitam de um sistema especializado para reparar o pareamento incorreto G-T.

7. Desnaturação de ácidos nucleicos Um oligonucleotídeo de duplex de DNA em que uma das cadeias tem a sequência TAATAC GACTCACTATAGGG tem uma temperatura de fusão (t_m) de 59°C. Se for construído um oligonucleotídeo duplex de RNA de sequência idêntica (substituindo U por T), a sua temperatura de fusão será superior ou inferior?

8. Dano espontâneo no DNA A hidrólise da ligação *N*-glicosídica entre a desoxirribose e uma purina no DNA cria um sítio AP. Um sítio AP gera uma desestabilização termodinâmica maior do que a criada por qualquer pareamento incorreto no DNA. Esse efeito não está completamente elucidado. Examine a estrutura de um sítio AP (ver Figura 8-30b) e descreva algumas consequências químicas dessa perda da base.

9. Predição da estrutura de ácido nucleico a partir de sua sequência Uma parte de um cromossomo sequenciado tem a sequência (em uma cadeia) ATTGCATCCGCGCGTGC GCGCGGATCCCGTTACTTTCCG. Qual parte dessa sequência é a mais provável de assumir a conformação Z?

10. Estrutura do ácido nucleico Explique por que a absorção de luz UV pelo DNA de dupla-fita aumenta (efeito hiper-crômico) quando o DNA é desnaturado.

11. Determinação de concentração de proteína em uma solução contendo proteínas e ácidos nucleicos

A concentração de proteína ou de ácidos nucleicos em uma solução contendo ambos pode ser estimada pelo uso de suas diferentes propriedades de absorção de luz: proteínas absorvem mais intensamente em 280 nm, e ácidos nucleicos, em 260 nm. Estimativas de suas respectivas concentrações em uma mistura podem ser feitas medindo-se a absorbância (A) da solução a 280 e 260 nm e usando a tabela na próxima página, a qual dá $R_{280/260}$, a razão das absorbâncias a 280 e 260 nm, a porcentagem da massa total, que é ácido nucleico, e o fator, F , que corrige a leitura a A_{280} e dá uma estimativa mais correta de proteína. A concentração de proteína (em mg/mL) = $F \times A_{280}$ (supondo que a cubeta tenha um caminho ótico de 1 cm). Calcule a concentração de proteína em uma solução de $A_{280} = 0,69$ e $A_{260} = 0,94$.

$R_{280/260}$	Proporção de ácido nucleico (%)	F
1,75	0,00	1,116
1,63	0,25	1,081
1,52	0,50	1,054
1,40	0,75	1,023
1,36	1,00	0,994
1,30	1,25	0,970
1,25	1,50	0,944
1,16	2,00	0,899
1,09	2,50	0,852
1,03	3,00	0,814
0,979	3,50	0,776
0,939	4,00	0,743
0,874	5,00	0,682
0,846	5,50	0,656
0,822	6,00	0,632
0,804	6,50	0,607
0,784	7,00	0,585
0,767	7,50	0,565
0,753	8,00	0,545
0,730	9,00	0,508
0,705	10,00	0,478
0,671	12,00	0,422
0,644	14,00	0,377
0,615	17,00	0,322
0,595	20,00	0,278

12. Solubilidade dos componentes de DNA Desenhe as seguintes estruturas e ordene suas solubilidades relativas em água (desde a mais solúvel até a menos solúvel): desoxirribose, guanina, fosfato. Como essas solubilidades são consistentes com a estrutura tridimensional do DNA de dupla-fita?

13. Reação em cadeia da polimerase Uma cadeia de DNA cromossômico está mostrada a seguir. Um pesquisador quer amplificar e isolar um fragmento de DNA definido pelo segmento mostrado em vermelho utilizando a reação em cadeia da polimerase. Proponha dois oligonucleotídeos iniciadores de PCR, cada um com 20 nucleotídeos de comprimento, que possam ser utilizados para amplificar esse segmento de DNA. O produto final de PCR gerado com seus oligonucleotídeos iniciadores não deve incluir sequências fora do segmento em vermelho.

5' – – – AATGCCGTCAGCCGATCTGCCTCGAGTCAATCGA
 TGCTGGTAACTTGGGGTATAAAGCTTACCCATGGTATCGTAG
 TTAGATTGATTGTTAGGTTCTTAGGTTTAGGTTTCTGGTATT
 GGTTTAGGGTCTTTGATGCTATTAATTGTTTGGTTTGTGATT
 GGTCTTTATATGGTTTATGTTTAAAGCCGGGTTTGTCTGG-
 GATGGTTCTGCTGATGTGCGCGTAGCGTGCGGCG – – – 3'

14. Sequenciamento genômico Em grandes projetos de sequenciamento genômico, os dados iniciais geralmente revelam lacunas onde não foi obtida nenhuma informação sobre a sequência. Para fechar essas lacunas, oligonucleotídeos iniciadores de DNA complementares à fita de extremidade 5' (i.e., idêntica à sequência da fita de extremidade 3') na extremidade de cada contig são extremamente úteis. Explique como esses oligonucleotídeos iniciadores podem ser utilizados.

15. Sequenciamento de última geração No sequenciamento de terminação reversível, como o processo de sequenciamento seria afetado se o grupo de bloqueio da extremidade 3' de cada nucleotídeo fosse substituído pelo 3'-H presente nos dideoxinucleotídeos usados no sequenciamento de Sanger?

16. Lógica do sequenciamento de Sanger No método de Sanger (didesóxi) para sequenciamento de DNA, uma pequena quantidade de dideoxirribonucleotídeo trifosfato, como ddCTP, é adicionada à reação de sequenciamento junto com uma grande quantidade do correspondente dCTP. Qual seria o resultado esperado se o dCTP fosse omitido?

17. Sequenciamento de DNA O seguinte fragmento de DNA foi sequenciado pelo método de Sanger. O asterisco vermelho indica um marcador fluorescente.



Uma amostra de DNA reagiu com a DNA-polimerase e com cada uma das misturas de nucleotídeos (em tampão apropriado) listadas a seguir. Dideoxinucleotídeos (ddNTP) foram adicionados em quantidades relativamente pequenas.

1. dATP, dTTP, dCTP, dGTP, ddTTP
2. dATP, dTTP, dCTP, dGTP, ddGTP
3. dATP, dCTP, dGTP, ddTTP
4. dATP, dTTP, dCTP, dGTP

O DNA resultante da reação foi separado por eletroforese em gel de agarose e foram localizadas as bandas fluorescentes. O padrão de bandas resultante da mistura de nucleotídeos 1 está a seguir. Supondo que todas as misturas fossem separadas no mesmo gel, qual seria a aparência das canaletas 2, 3 e 4?



18. Fosfodiesterase de veneno de serpentes Uma exonuclease é uma enzima que cliva nucleotídeos sequencialmente a partir da extremidade de uma cadeia polinucleotídica. A fosfodiesterase de veneno de serpentes, a qual hidrolisa nucleotídeos a partir da extremidade 3' de qualquer nucleotídeo com um grupo 3'-hidroxila livre, cliva entre o 3'-hidroxila da ribose ou da desoxirribose e o grupo fosforila do próximo nucleotídeo. Ela age no RNA ou no DNA de cadeia simples e não tem especificidade de base. Essa enzima foi usada em experimentos de determinação de sequência antes do desenvolvimento de técnicas modernas de sequenciamento de ácidos nucleicos. Quais são os produtos da digestão parcial por fosfodiesterase de veneno de serpente de um oligonucleotídeo com a sequência (5')GCGCAUUGC(3')—OH?

19. Preservação do DNA em endósporos bacterianos Os endósporos de bactérias se formam quando o ambiente não mais permite o metabolismo celular ativo. Na bactéria de solo *Bacillus subtilis*, por exemplo, o processo de esporulação começa quando um ou mais nutrientes estiverem esgotados. O produto final é uma estrutura pequena e metabolicamente dormente que pode sobreviver quase indefinidamente sem nenhum metabolismo detectável. Os esporos têm mecanismos que evitam o acúmulo de mutações potencialmente letais ao seu metabolismo por períodos de dormência que podem ultrapassar 1.000 anos. Os esporos de *B. subtilis* são muito mais resistentes ao calor, à radiação UV e a agentes oxidantes (agentes mutagênicos), que promovem mutações, do que a bactéria em crescimento.

- (a) Um fator que evita potencial dano ao DNA é a grande diminuição no seu conteúdo de água. Como isso afetaria alguns tipos de mutações?
- (b) Os endósporos têm uma categoria de proteínas denominada pequenas proteínas solúveis em ácido (SASP, do inglês, *small acid-soluble proteins*), que se ligam ao DNA, evitando a formação de dímeros do tipo ciclobutano. O que causa os dímeros de ciclobutano e por que os endósporos bacterianos necessitam de mecanismos para prevenir a sua formação?

20. Síntese de oligonucleotídeos No esquema da Figura 8-34, cada nova base a ser adicionada ao oligonucleotídeo que está sendo alongado é modificada de forma que o seu grupo 3'-hidroxila é ativado, e o grupo 5'-hidroxila está ligado a um grupo dimetoxitritil (DMT). Qual é a função do grupo DMT na base que está sendo adicionada?

Bioquímica online

21. A estrutura do DNA A elucidação da estrutura tridimensional do DNA ajudou os pesquisadores a entender como essa molécula carrega informação que pode ser fielmente replicada de uma geração para a próxima. Para ver a estrutura secundária do DNA de dupla-fita, vá ao *site* do Protein Data Bank (www.rcsb.org). Use os identificadores do PDB listados a seguir para ver os resumos da estrutura para as duas formas

de DNA. Visualize a estrutura 3D usando JSmol (clique na guia 3D View ou no *link* JSmol na janela Structure Image na página de resumo). Você precisará usar os menus de exibição na tela e os controles de *script* no menu JSmol (acessado clicando no logotipo JSmol, no canto inferior direito da tela da imagem) para concluir os exercícios a seguir. Recorra ao *link* de ajuda do Jmol, se necessário.

- Acessar PDB ID 141D, uma sequência de DNA repetida e altamente conservada do final do genoma do HIV-1 (o vírus que causa a Aids). Defina o estilo para esfera e bastão. Em seguida, use os controles de *script* para colorir por elemento (Color > Atoms > By Scheme > Element (CPK)). Identifique o esqueleto açúcar-fosfato para cada cadeia do duplex de DNA. Localize e identifique bases individuais. Identifique a extremidade 5' de cada cadeia. Localize o sulco maior e o sulco menor. Esta hélice está voltada para a direita ou para a esquerda?
- Acesse PDB ID 145D, um DNA com a conformação Z. Defina o estilo para esfera e bastão. Use os controles de *script* para colorir por elemento (Main Menu > Color > Atoms > By Scheme > Element (CPK)). Identifique o esqueleto açúcar-fosfato para cada cadeia do duplex de DNA. Esta hélice está voltada para a direita ou para a esquerda?
- Para avaliar precisamente a estrutura secundária de DNA, ver a molécula na forma tridimensional. Do controle de *script* Main Menu, selecione Style > Stereographic > Cross-eyed viewing ou Wall-eyed viewing. (Se você tiver óculos estereográficos disponíveis, selecione a opção apropriada.) Você verá duas imagens da molécula de DNA. Coloque o seu nariz a aproximadamente 25 centímetros do monitor e olhe a ponta dele (com os olhos cruzados) ou as margens opostas da tela do monitor (com os olhos para os lados). No fundo, você poderá ver três imagens da hélice de DNA. Mude o foco do olhar para a imagem do meio, que aparecerá em três dimensões. (Lembre-se de que apenas um dos dois autores deste livro consegue fazer isso.)

Problema de análise de dados

22. Estudos de Chargaff da estrutura do DNA A seção do capítulo “DNA é uma dupla-hélice que armazena informação genética” inclui um resumo dos principais achados de Erwin Chargaff e colaboradores, listados como quatro conclusões (“Regras de Chargaff”, p. 286). Neste problema, você examinará os dados que Chargaff coletou para sustentar essas conclusões.

Em um artigo, Chargaff (1950) descreveu seus métodos analíticos e alguns resultados preliminares. Em resumo, ele tratou as amostras de DNA com ácido para remover as bases, separou as bases por cromatografia de papel e mediu a quantidade de cada base por espectroscopia de UV. Seus resultados estão mostrados nas três tabelas a seguir. A relação molar é a razão entre o número de moles de cada base na amostra pelo número de moles de fosfato na amostra – isso dá a fração do número total de bases representada por cada base específica. O *rendimento* é a soma das quatro bases (a soma das relações molares). A recuperação completa de todas as bases no DNA daria um rendimento de 1,0.

Relação molar no DNA de boi

Base	Timo			Baço		Fígado
	Prep. 1	Prep. 2	Prep. 3	Prep. 1	Prep. 2	Prep. 1
Adenina	0,26	0,28	0,30	0,25	0,26	0,26
Guanina	0,21	0,24	0,22	0,20	0,21	0,20
Citosina	0,16	0,18	0,17	0,15	0,17	
Timina	0,25	0,24	0,25	0,24	0,24	
<i>Rendimento</i>	<i>0,88</i>	<i>0,94</i>	<i>0,94</i>	<i>0,84</i>	<i>0,88</i>	

Relação molar no DNA humano

Base	Esperma		Timo	Fígado	
	Prep. 1	Prep. 2	Prep. 1	Normal	Carcinoma
Adenina	0,29	0,27	0,28	0,27	0,27
Guanina	0,18	0,17	0,19	0,19	0,18
Citosina	0,18	0,18	0,16		0,15
Timina	0,31	0,30	0,28		0,27
<i>Rendimento</i>	<i>0,96</i>	<i>0,92</i>	<i>0,91</i>		<i>0,87</i>

Relação molar no DNA de microrganismos

Base	Leveduras		Bacilo da tuberculose aviária
	Prep. 1	Prep. 2	Prep. 1
Adenina	0,24	0,30	0,12
Guanina	0,14	0,18	0,28
Citosina	0,13	0,15	0,26
Timina	0,25	0,29	0,11
<i>Rendimento</i>	<i>0,76</i>	<i>0,92</i>	<i>0,77</i>

- Com base nesses dados, Chargaff concluiu que “até agora, nenhuma diferença foi encontrada na composição do DNA dos diferentes tecidos de uma mesma espécie”. Isso corresponde à conclusão 2, mencionada neste capítulo. Entretanto, uma visão cética dos mesmos dados poderia concluir: com certeza, eles parecem diferentes! Se você fosse Chargaff, como usaria os dados para convencer algum cético a mudar de ideia?
- A composição de bases do DNA de células hepáticas normais e de células hepáticas cancerosas (hepatocarcinoma) não foi significativamente diferente. Você esperaria que a técnica de Chargaff fosse capaz de detectar uma diferença entre o DNA de células normais e o de células cancerosas? Explique o raciocínio utilizado.

Como você pode imaginar, os dados de Chargaff não foram completamente convincentes. Ele continuou a aprimorar suas técnicas, como descrito no artigo posterior (Chargaff, 1951), em que ele descreveu relações molares de bases no DNA de vários organismos:

Fonte	A:G	T:C	A:T	G:C	Purina:pirimidina
Boi	1,29	1,43	1,04	1,00	1,1
Homem	1,56	1,75	1,00	1,00	1,0
Galinha	1,45	1,29	1,06	0,91	0,99
Salmão	1,43	1,43	1,02	1,02	1,02
Trigo	1,22	1,18	1,00	0,97	0,99
Leveduras	1,67	1,92	1,03	1,20	1,0
<i>Haemophilus influenzae</i> tipo c	1,74	1,54	1,07	0,91	1,0
<i>E. coli</i> K-12	1,05	0,95	1,09	0,99	1,0
Bacilo da tuberculose aviária	0,4	0,4	1,09	1,08	1,1
<i>Serratia marcescens</i>	0,7	0,7	0,95	0,86	0,9
<i>Bacillus schatz</i>	0,7	0,6	1,12	0,89	1,0

- (c) De acordo com Chargaff, como exposto na conclusão 1, neste capítulo, “A composição de bases do DNA geralmente varia de uma espécie para a outra”. Dê um argumento, com base nos dados apresentados até agora, que sustente essa conclusão.
- (d) De acordo com a conclusão 4, “Em todos os DNA celulares, independentemente da espécie, . . . $A + G = T + C$ ”. Dê um argumento, com base nos dados apresentados até agora, que sustente essa conclusão.

Parte da intenção de Chargaff foi refutar a “hipótese do tetranucleotídeo”. Essa era a ideia de que o DNA era um polímero monótono de tetranucleotídeos $(AGCT)_n$ e, portanto, incapaz de conter informação de sequências. Apesar de os dados apresentados anteriormente demonstrarem

que o DNA não pode ser simplesmente um tetranucleotídeo – se fosse, todas as amostras teriam relações molares de 0,25 para cada base –, ainda seria possível que o DNA de diferentes organismos fosse levemente mais complexo na forma de sequências repetidas, mas ainda monótono.

Para tratar dessa questão, Chargaff pegou DNA de germe de trigo e o tratou com a enzima desoxirribonuclease por diferentes períodos. Em cada intervalo de tempo, uma parte do DNA foi convertida a fragmentos pequenos, e os fragmentos grandes restantes foram chamados de “cerne”. Na tabela a seguir, o percentual de “19% do cerne” corresponde aos fragmentos grandes remanescentes quando 81% do DNA foram degradados; “8% do cerne” correspondem aos fragmentos grandes remanescentes após 92% de degradação.

Base	DNA intacto	19% do cerne	8% do cerne
Adenina	0,27	0,33	0,35
Guanina	0,22	0,20	0,20
Citosina	0,22	0,16	0,14
Timina	0,27	0,26	0,23
<i>Rendimento</i>	<i>0,98</i>	<i>0,95</i>	<i>0,92</i>

- (e) Como você usaria esses dados para argumentar que o DNA de germe de trigo não é uma sequência repetitiva monótona?

Referências

- Chargaff, E. 1950.** Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation. *Experientia* 6:201–209.
- Chargaff, E. 1951.** Structure and function of nucleic acids as cell constituents. *Fed. Proc.* 10:654–659.

Esta página foi deixada em branco intencionalmente.

Tecnologias baseadas nas informações do DNA

- 9.1 Estudando os genes e seus produtos 320
- 9.2 Utilização de métodos com base no DNA para a compreensão das funções das proteínas 335
- 9.3 Genômica e história da humanidade 344

A complexidade das moléculas e dos sistemas apresentados neste livro pode, algumas vezes, ocultar uma realidade bioquímica: o que aprendemos até agora é apenas o começo. Novos lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos são descobertos a cada dia e, com frequência, não se tem ideia sobre suas funções. Quantos ainda serão descobertos e quais serão suas funções? Até mesmo moléculas bem caracterizadas continuam a desafiar os pesquisadores com inúmeras questões mecânicas e funcionais não resolvidas. Uma nova era, definida pelas tecnologias que permitem amplo acesso ao conjunto do DNA da célula, o genoma, teve progresso acelerado.

A palavra “genoma”, proposta pelo botânico alemão Hans Winkler, em 1920, foi derivada simplesmente pela combinação *gene* e a sílaba final de *cromossomo*. Um **genoma**, hoje, é definido como o conjunto genético haploide completo de um organismo. Na verdade, um genoma é uma cópia da informação hereditária necessária para especificar um organismo. Para organismos que se reproduzem sexualmente, o genoma inclui um conjunto de autossomos e um de cada tipo dos cromossomos sexuais. Quando as células têm organelas que também apresentam DNA, o conteúdo genético das organelas não é considerado parte do genoma nuclear. As mitocôndrias, encontradas na maioria das células eucarióticas, e os cloroplastos, nas células que captam luz dos organismos fotossintéticos, têm seu próprio genoma. Para vírus, que podem ter material genético composto por DNA ou RNA, o genoma é uma cópia completa dos ácidos nucleicos para especificar o vírus.

As milhares de sequências genômicas completas já conhecidas fornecem uma estimativa da imensidão da tarefa à frente. Simplificando, não são conhecidas as funções da maior parte do DNA – em geral, incluindo a metade ou mais dos genes – em um genoma típico. Entretanto, essas mesmas sequências genômicas também fornecem oportunidades sem precedentes. Não há melhor fonte de informações sobre uma célula ou organismo do que a inserida em seu

próprio DNA. As tecnologias abordadas neste capítulo (juntamente com várias abordadas no Capítulo 8) permitem que se tire vantagem dessa fonte de informações, e elas atingem cada tópico que será abordado nos capítulos subsequentes.

Como objetos de estudo, as moléculas de DNA apresentam um problema específico: o seu tamanho. Sem dúvida, os cromossomos são as maiores biomoléculas na célula. Como um pesquisador descobre a informação que procura quando só uma pequena parte de um cromossomo inclui milhões ou até bilhões de pares de bases contíguos? Soluções para esses problemas começaram a surgir na década de 1970.

Décadas de avanços por milhares de cientistas que trabalham em genética, bioquímica, biologia celular e físico-química foram unidas nos laboratórios de Paul Berg, Herbert Boyer e Stanley Cohen para produzir as primeiras técnicas de detecção, isolamento, preparação e estudo de pequenos segmentos de DNA derivados de cromossomos muito maiores. As tecnologias avançadas descritas no Capítulo 8 continuam evoluindo e melhorando, sendo acompanhadas de perto. Em 1986, Thomas H. Roderick, do Laboratório Jackson, em Bar Harbor, Maine, sugeriu *Genômica* como o nome de um novo periódico e a palavra acabou definindo uma nova área de estudo. A ciência moderna da **genômica** é dedicada ao estudo do DNA em escala celular. Por sua vez, a genômica contribui para a **biologia de sistemas**, o estudo da bioquímica na escala celular e de organismos inteiros.

Cada aluno ou instrutor, quando considera os temas apresentados neste capítulo, depara-se com um conflito. Primeiro, os métodos aqui descritos foram possíveis graças aos avanços na compreensão do metabolismo do DNA e do RNA. Assim, é preciso entender alguns conceitos fundamentais da replicação do DNA, transcrição do RNA, síntese proteica e regulação gênica para entender como esses métodos funcionam. Ao mesmo tempo, no entanto, a bioquímica moderna se baseia nesses mesmos métodos, de modo que uma abordagem atual sobre qualquer aspecto da disciplina se torna muito difícil sem uma introdução adequada a eles. Apresentar esses métodos no início do livro é reconhecer que eles estão intrinsecamente interligados tanto aos avanços que lhes deram origem quanto às mais novas descobertas que eles hoje tornam possíveis. Esses conceitos básicos e necessários fazem da presente discussão não apenas uma introdução à tecnologia, mas também uma prévia de muitos dos fundamentos da bioquímica do DNA e do RNA encontrados nos capítulos posteriores.



Paul Berg
[Fonte: NIH National Library of Medicine.]



Herbert Boyer
[Fonte: cortesia da Dr. Jane Gitschier.]



Stanley N. Cohen
[Fonte: NIH National Library of Medicine.]

Inicialmente, são destacados os princípios de clonagem do DNA e, em seguida, ilustrados a variedade de aplicações e o potencial de muitas das tecnologias mais recentes que apoiam e aceleram o avanço da bioquímica.

9.1 Estudando os genes e seus produtos

Uma pesquisadora isolou uma nova enzima que é a chave para uma doença humana. Ela espera isolar grandes quantidades da proteína, a fim de cristalizá-la para seu estudo e análise estrutural. Ela quer alterar resíduos de aminoácidos no sítio ativo da enzima para poder compreender a reação catalisada por ela. A pesquisadora prepara um sofisticado programa de pesquisa para elucidar como essa enzima interage e é regulada por outras proteínas na célula. Tudo isso, e muito mais, torna-se possível se ela conseguir obter o gene que codifica a enzima. Infelizmente, esse gene consiste de alguns milhares de pares de bases no interior de um cromossomo humano, com um tamanho medido em centenas de milhares de pares de bases. Como ela isolará o pequeno segmento de que necessita para, então, estudá-lo? A resposta encontra-se na clonagem do DNA e em métodos desenvolvidos para manipular genes clonados.

Genes podem ser isolados por clonagem do DNA

Um *clone* é uma cópia idêntica. Esse termo foi originalmente aplicado a células de um único tipo, isoladas e cultivadas para criar uma população de células idênticas. Quando aplicado ao DNA, um clone representa muitas cópias idênticas de um segmento específico do gene. Em resumo, a pesquisadora deve cortar o gene de um cromossomo grande, anexá-lo a uma porção muito menor de DNA transportador e permitir que microrganismos façam muitas cópias dessa porção para ela. Esse é o processo de **clonagem de DNA**. O resultado é a amplificação seletiva de um gene ou segmento de DNA específico de forma que possa ser isolado e estudado. Classicamente, a clonagem de DNA a partir de qualquer organismo envolve cinco procedimentos gerais:

1. *Obtenção do segmento de DNA a ser clonado.* Enzimas denominadas endonucleases de restrição atuam como tesouras moleculares precisas, reconhecendo

sequências específicas no DNA e cortando o DNA genômico em fragmentos menores, adequados para clonagem. De modo alternativo, o DNA genômico pode ser cortado aleatoriamente em fragmentos de tamanho desejado. Considerando-se que sequências de regiões genômicas alvo são frequentemente conhecidas (disponíveis em banco de dados), alguns segmentos de DNA para serem clonados são amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) ou são simplesmente sintetizados (ambos os métodos foram descritos no Capítulo 8).

2. *Selecionando uma molécula pequena de DNA com replicação autônoma.* Es-

ses DNAs pequenos são denominados **vetores de clonagem** (um vetor é um agente transportador ou de entrega). A maioria dos vetores de clonagem usados em laboratório são versões modificadas de moléculas de DNA pequenas que ocorrem naturalmente em bactérias e eucariotos inferiores, como os fungos. Os DNAs virais pequenos também podem ter esse papel.

3. *Ligar covalentemente dois fragmentos de DNA.* A enzima DNA-ligase une o vetor de clonagem ao fragmento de DNA a ser clonado. As moléculas de DNA compostas dessa forma, abrangendo segmentos de duas ou mais origens ligados covalentemente, são denominadas **DNAs recombinantes**.
4. *Movendo o DNA recombinante do tubo de ensaio para o hospedeiro.* O organismo hospedeiro fornece a maquinaria enzimática para a replicação do DNA.
5. *Seleção ou identificação das células hospedeiras que contêm DNA recombinante.* O vetor de clonagem tem características que permitem a sobrevivência das células hospedeiras em um ambiente em que as células que não contêm o vetor morreriam. As células que contêm o vetor são, então, “selecionáveis” naquele ambiente.

Os métodos utilizados para realizar essas e outras tarefas relacionadas são coletivamente chamados de **tecnologia do DNA recombinante** ou, de modo mais informal, de **engenharia genética**.

Muito da discussão inicial teve como foco a clonagem de DNA na bactéria *Escherichia coli*, o primeiro organismo usado para trabalho com DNA recombinante e, ainda hoje, a célula hospedeira mais comum. A *E. coli* apresenta muitas vantagens: o metabolismo do seu DNA (como muitos outros de seus processos bioquímicos) é bem conhecido; muitos vetores de clonagem que ocorrem naturalmente associados à *E. coli*, como plasmídeos e bacteriófagos (vírus bacterianos, também chamados de fagos), estão bem caracterizados; e existem técnicas para transportar o DNA rapidamente de uma célula bacteriana a outra. Os princípios aqui discutidos são amplamente aplicáveis à clonagem de DNA em outros organismos, tópico discutido de forma mais detalhada mais adiante na seção.

TABELA 9-1 Algumas enzimas usadas na tecnologia do DNA recombinante

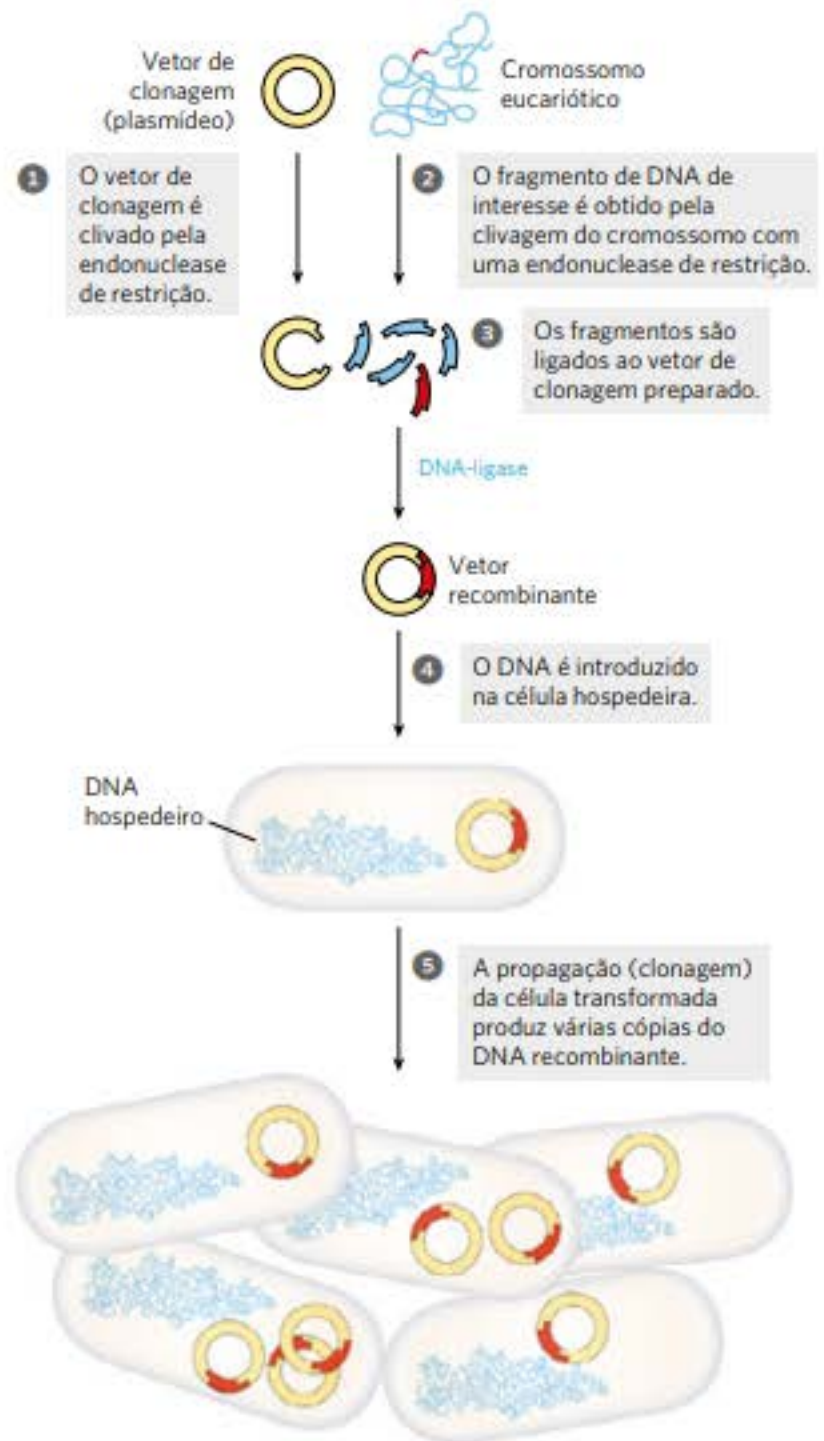
Enzima(s)	Função
Endonucleases de restrição tipo II	Cortam moléculas de DNA em sequências de base específicas
DNA-ligase	Liga duas moléculas ou fragmentos de DNA
DNA-polimerase I (<i>E. coli</i>)	Preenche lacunas em DNAs de dupla-fita com adição gradual de nucleotídeos à extremidade 3'
Transcriptase reversa	Sintetiza uma cópia de DNA a partir de uma molécula de RNA
Polinucleotídeo-cinase	Adiciona um fosfato à extremidade 5'-OH de um polinucleotídeo para marcá-lo ou permitir ligação
Transferase-terminal	Adiciona caudas de homopolímero à extremidade 3'-OH de uma dupla-fita linear
Exonuclease III	Remove resíduos de nucleotídeos da extremidade 3' de uma fita de DNA
Exonuclease do bacteriófago λ	Remove nucleotídeos da extremidade 5' de DNA de dupla-fita para expor a extremidade 3' de DNA de fita simples
Fosfatase alcalina	Remove fosfatos terminais da extremidade 5' ou 3' (ou ambas)

Endonucleases de restrição e DNA-ligases produzem DNA recombinante

Um conjunto de enzimas (Tabela 9-1), que se tornou disponível ao longo de décadas de pesquisa no metabolismo de ácidos nucleicos, é particularmente importante para a tecnologia do DNA recombinante. Duas classes de enzimas estão no centro da abordagem clássica para a geração e propagação da molécula de DNA recombinante (**Figura 9-1**). Em primeiro lugar, as **endonucleases de restrição** (também chamadas de enzimas de restrição) reconhecem e clivam o DNA em sequências específicas (sequências de reconhecimento ou sítios de restrição) para gerar um conjunto de fragmentos menores. Em segundo lugar, o fragmento do DNA a ser clonado é unido a um vetor de clonagem adequado, por meio de **DNA-ligases**, para unir as moléculas de DNA. O vetor recombinante é, então, introduzido em uma célula hospedeira que amplifica o fragmento no curso de muitas gerações de divisão celular.

Endonucleases de restrição são encontradas em um grande número de espécies bacterianas. No início da década de 1960, Werner Arber descobriu que a função biológica dessas enzimas consiste em reconhecer e clivar DNA exógeno (p. ex., o DNA de um vírus infeccioso); esse DNA é conhecido como *restrito*. No DNA da célula hospedeira, a sequência que poderia ser reconhecida por sua própria endonuclease de restrição é protegida da digestão pela metilação do DNA, catalisada por uma DNA-metilase específica.

FIGURA 9-1 Ilustração esquemática da clonagem do DNA. Um vetor de clonagem e cromossomos eucarióticos são clivados separadamente com a mesma endonuclease de restrição (um único cromossomo é mostrado para fins de simplificação). Os fragmentos a serem clonados são, então, ligados ao vetor de clonagem. O DNA recombinante resultante (apenas um vetor recombinante é mostrado aqui) é introduzido em uma célula hospedeira, onde pode ser propagado (clonado). Observe que este desenho não está em escala: o tamanho do cromossomo de *E. coli* em relação àquele de um típico vetor de clonagem (como um plasmídeo) é muito maior do que o mostrado aqui.



A endonuclease de restrição e a DNA-metilase correspondente são chamadas algumas vezes de **sistema de restrição-modificação**.

Há três tipos de endonucleases de restrição, designadas I, II e III. Os tipos I e III são complexos geralmente grandes com múltiplas subunidades, contendo atividades tanto de endonuclease quanto de metilase. As endonucleases de restrição tipo I clivam o DNA em sítios aleatórios que podem estar a mais de 1.000 pares de bases (pb) da sequência de reconhecimento. As endonucleases de restrição tipo III clivam o DNA a cerca de 25 pb da sequência de reconhecimento. Ambos os tipos se movem ao longo do DNA em uma reação que usa energia do ATP. As **endonucleases de restrição tipo II**, isoladas pela primeira vez por Hamilton Smith, em 1970, são mais simples, não requerem ATP e catalisam a clivagem hidrolítica de ligações fosfodiésteres específicas no DNA dentro da própria sequência de reconhecimento. A extraordinária utilidade desse grupo de endonucleases de restrição foi demonstrada por Daniel Nathans, o primeiro a utilizá-las para desenvolver novos métodos de mapeamento e análise de genes e genomas.

Milhares de endonucleases de restrição tipo II foram descobertos em diferentes espécies bacterianas, e mais de 100 sequências de DNA diferentes são reconhecidas por uma ou mais dessas enzimas. As sequências de reconhecimento têm, em geral, de 4 a 6 pb e são palindrômicas (ver Figura 8-18). A Tabela 9-2 lista as sequências reconhecidas por algumas endonucleases tipo II.

Algumas endonucleases de restrição fazem cortes ordenados nas duas fitas do DNA, deixando dois a quatro nucleotídeos de uma fita não pareados em cada extremida-

de. Essas fitas não pareadas são chamadas de **extremidades coesivas (Figura 9-2a)**, pois formam pares de bases entre si ou com extremidades coesivas complementares de outros fragmentos de DNA. Outras endonucleases de restrição clivam ambas as fitas de DNA de forma reta, em ligações fosfodiésteres opostas, não deixando pares de bases não pareados, frequentemente denominadas **extremidades cegas (Figura 9-2b)**.

O tamanho médio dos fragmentos de DNA produzidos pela clivagem do DNA genômico com uma endonuclease de restrição depende da frequência com que um sítio específico de restrição ocorre na molécula do DNA, que, por sua vez, depende muito do tamanho da sequência de reconhecimento.

Em uma molécula de DNA com sequência aleatória na qual todos os quatro nucleotídeos são igualmente abundantes, uma sequência de 6 pb reconhecida por uma endonuclease de restrição, como BamHI, pode ocorrer, em média, uma vez a cada 4^6 (4.096) pb. Enzimas que reconhecem uma sequência de 4 pb produzem fragmentos de DNA menores a partir de uma molécula de DNA com sequência aleatória; uma sequência de reconhecimento desse tamanho ocorreria mais ou menos a cada 4^4 (256) pb. Em moléculas naturais de DNA, sequências de reconhecimento específicas tendem a ocorrer com menos frequência do que essas, uma vez que as sequências nucleotídicas no DNA não são aleatórias e os quatro nucleotídeos não são igualmente abundantes. Em experimentos laboratoriais, o tamanho médio de fragmentos produzidos pela clivagem por endonucleases de restrição de um DNA grande pode ser aumentado simplesmente terminando a reação antes de se completar o processo; o re-

TABELA 9-2 Sequências de reconhecimento para algumas endonucleases de restrição tipo II

<i>Bam</i> HI	<pre> ↓ (5') G G A T C C (3') * C C T A G G ↑ </pre>	<i>Hind</i> III	<pre> ↓ (5') A A G C T T (3') T T C G A A ↑ </pre>
<i>Cla</i> I	<pre> ↓ (5') A T C G A T (3') T A G C T A * ↑ </pre>	<i>Not</i> I	<pre> ↓ (5') G C G G C C G C (3') C G C C G G C G ↑ </pre>
<i>Eco</i> RI	<pre> ↓ (5') G A A T T C (3') C T T A A G * ↑ </pre>	<i>Pst</i> I	<pre> ↓ (5') C T G C A G (3') G A C G T C * ↑ </pre>
<i>Eco</i> RV	<pre> ↓ (5') G A T A T C (3') C T A T A G ↑ </pre>	<i>Pvu</i> II	<pre> ↓ (5') C A G C T G (3') G T C G A C ↑ </pre>
<i>Hae</i> III	<pre> ↓ (5') G G C C (3') C C G G * ↑ </pre>	<i>Tth</i> 111I	<pre> ↓ (5') G A C N N N G T C (3') C T G N N N C A G ↑ </pre>

Nota: as setas indicam as ligações fosfodiéster clivadas por cada endonuclease de restrição. Os asteriscos indicam bases metiladas pela metilase correspondente (quando conhecida). N denota qualquer base. Observe que o nome de cada enzima consiste em uma abreviação de três letras da espécie bacteriana da qual ela deriva, por vezes seguida por designação da linhagem e de números romanos para distinguir diferentes endonucleases de restrição isoladas das mesmas espécies bacterianas. Então, BamHI é a primeira (I) endonuclease de restrição caracterizada isolada da linhagem H do *Bacillus amyloliquefaciens*.

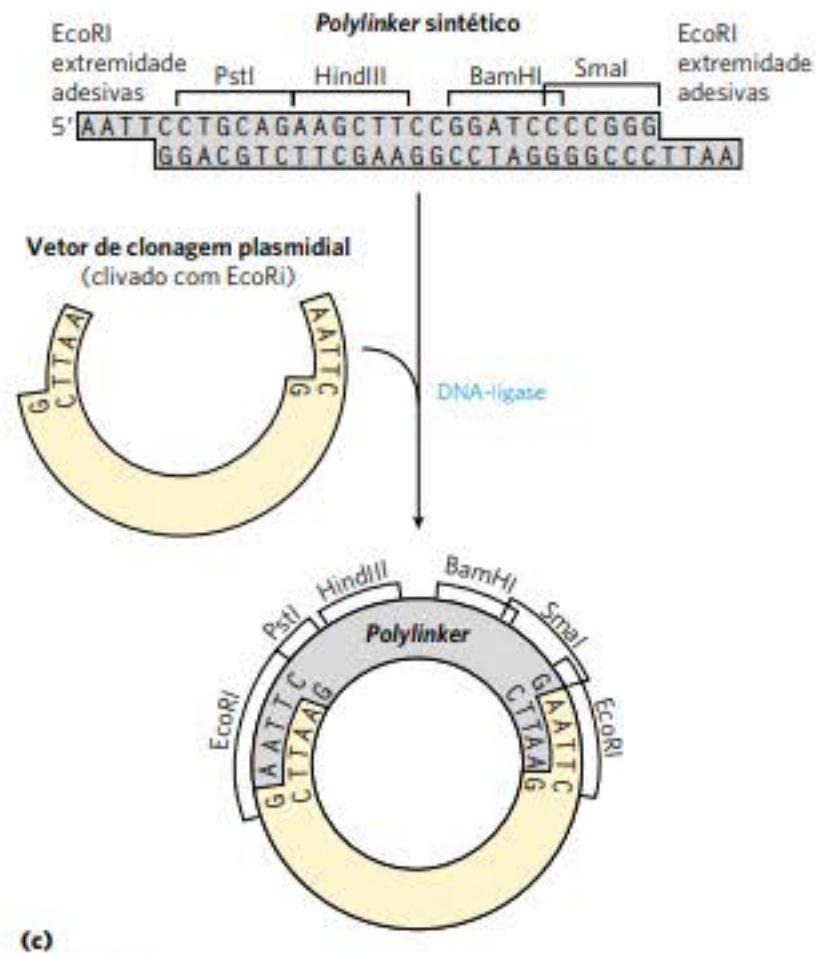
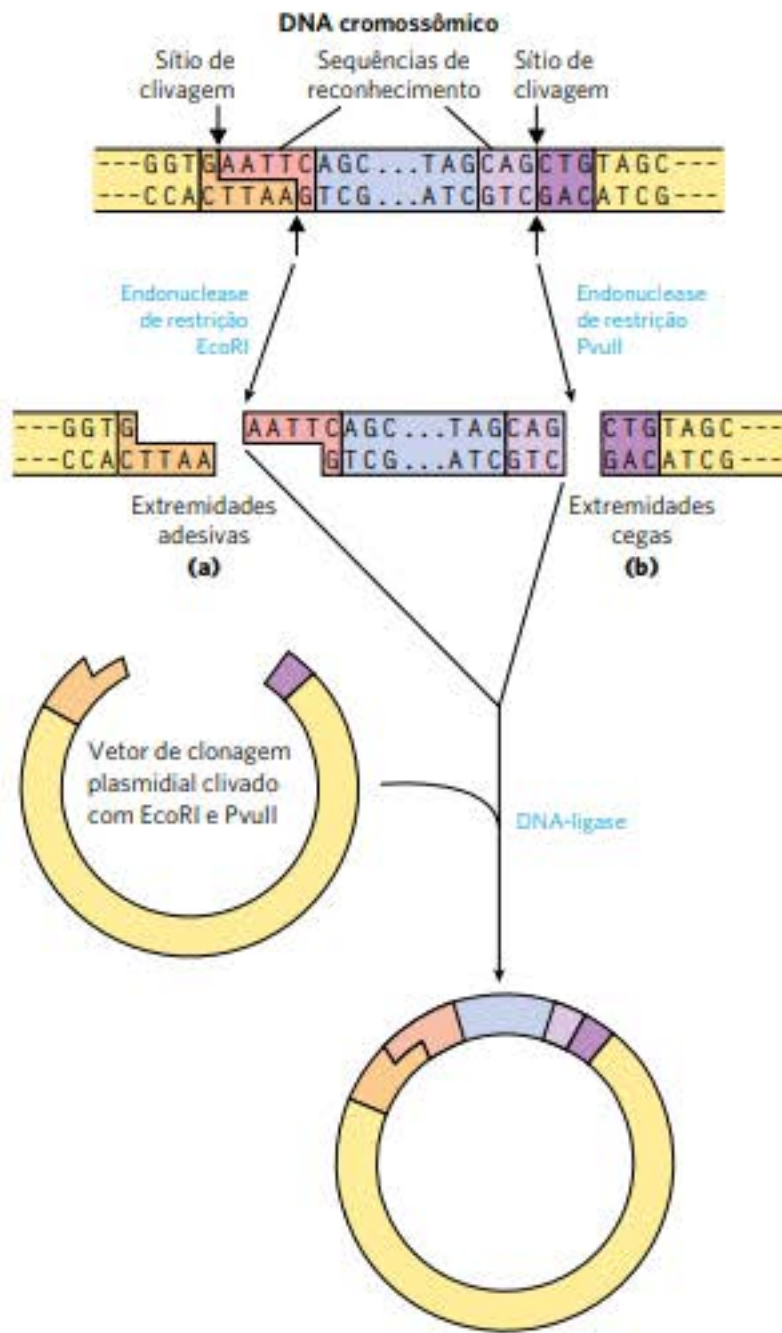


FIGURA 9-2 Clivagem de moléculas de DNA por endonucleases de restrição. As endonucleases de restrição reconhecem e clivam apenas sequências específicas, deixando tanto as extremidades coesivas (a) (com fitas simples salientes) quanto as extremidades cegas (b). Os fragmentos podem se ligar a outros DNAs, como o vetor de clonagem clivado (um plasmídeo) mostrado aqui. Esta reação é facilitada pela renaturação das extremidades coesivas complementares. A ligação é menos eficiente para os fragmentos de DNA com extremidades cegas do que para aqueles com extremidades coesivas complementares, e os fragmentos de DNA com diferentes extremidades coesivas (não complementares) geralmente não se ligam. (c) Um fragmento de DNA sintético com sequências de reconhecimento para várias endonucleases de restrição pode ser inserido em um plasmídeo que foi clivado por uma endonuclease de restrição. A inserção é chamada de *linker*; uma inserção com múltiplos sítios de restrição é chamada de *polylinker*.

sultado é chamado de digestão parcial. O tamanho médio do fragmento também pode ser aumentado utilizando-se uma classe especial de endonucleases, chamadas de endonucleases *homing* (ver Figura 26-37). Elas reconhecem e clivam sequências de DNA muito maiores (14 a 20 pb).

Uma vez que a molécula de DNA tenha sido clivada em fragmentos, um determinado fragmento de tamanho conhecido pode ser parcialmente purificado por meio de eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida (p. 302) ou por HPLC (p. 92). Para um genoma típico de mamífero, entretanto, a clivagem por endonucleases de restrição geralmente produz um número muito grande de fragmentos de DNA diferentes para permitir o isolamento adequado de um segmento específico. Uma etapa intermediária comum na clonagem de um gene específico ou segmento de DNA é a construção de uma biblioteca de DNA (descrita na Seção 9.2).

Após o isolamento do fragmento de DNA-alvo, a DNA-ligase pode ser utilizada para uni-lo a um vetor de clonagem

digerido de modo semelhante – isto é, um vetor digerido pela *mesma* endonuclease de restrição; um fragmento gerado por EcoRI, por exemplo, em geral não irá se unir a um fragmento gerado por BamHI. Como descrito mais detalhadamente no Capítulo 25 (ver Figura 25-16), a DNA-ligase catalisa a formação de novas ligações fosfodiésteres em uma reação que utiliza ATP ou um cofator semelhante. O pareamento de bases das extremidades coesivas complementares facilita muito a reação da ligação (Figura 9-2a). As extremidades cegas também podem ser ligadas, embora com menos eficiência. Os pesquisadores podem criar novas sequências de DNA para uma ampla gama de propósitos pela inserção de fragmentos de DNA sintéticos, chamados de *linkers*, para aproximar as extremidades que estão sendo ligadas. Fragmentos de DNA inseridos com múltiplas sequências de reconhecimento para endonucleases de restrição (frequentemente úteis como pontos para posterior inserção de DNA adicional por clivagem e ligação) são chamados de *polylinkers* (Figura 9-2c).

A eficácia das extremidades coesivas em unir seletivamente dois fragmentos de DNA ficou aparente nos primeiros experimentos com DNA recombinante. Antes que as endonucleases estivessem amplamente disponíveis, alguns pesquisadores descobriram que podiam gerar extremidades coesivas pela ação combinada da exonuclease do bacteriófago λ e da enzima terminal-transferase (Tabela 9-1). Caudas homopoliméricas complementares foram adicionadas aos fragmentos a serem unidos. Peter Lobban e Dale Kaiser utilizaram esse método, em 1971, nos primeiros experimentos para unir fragmentos de DNA de ocorrência natural. Métodos semelhantes foram usados logo após no laboratório de Paul Berg para unir segmentos de DNA do vírus de símio 40 (SV40) ao DNA derivado do bacteriófago λ , criando, assim, a primeira molécula de DNA recombinante com segmentos de DNA de espécies diferentes.

Os vetores de clonagem permitem a amplificação dos segmentos de DNA inseridos

Os princípios que regem a liberação de DNA recombinante em uma forma clonável a uma célula hospedeira e sua posterior amplificação nessa célula são bem ilustrados considerando-se dois vetores de clonagem comuns: os plasmídeos e os cromossomos artificiais de bactérias, utilizados em experimentos com *E. coli* e um vetor usado para clonar segmentos de DNA grandes em levedura.

Plasmídeos Um plasmídeo é uma molécula de DNA circular que se replica separadamente do cromossomo hospedeiro. A grande variedade de plasmídeos bacterianos que ocorre naturalmente varia de tamanho de 5.000 a 400.000 pb. Muitos dos plasmídeos encontrados em populações bacterianas são um pouco mais do que parasitas moleculares, semelhantes aos vírus, mas com capacidade mais limitada de se transferir de uma célula para outra. Para sobreviver na célula hospedeira, os plasmídeos incorporam várias sequências especializadas que os tornam capazes de utilizar a energia das células para sua própria replicação e expressão gênica.

Os plasmídeos de ocorrência natural têm um papel simbiótico na célula: são capazes de fornecer genes de resistência a antibióticos ou que realizam novas funções para a célula. Por exemplo, o plasmídeo Ti de *Agrobacterium tumefaciens* torna a bactéria hospedeira capaz de colonizar as células de plantas e se utilizar de sua energia. As mesmas propriedades que tornam os plasmídeos capazes de sobreviverem em um hospedeiro bacteriano ou eucariótico são úteis para os biólogos moleculares desenvolverem um vetor para a clonagem de um segmento específico de DNA. O clássico plasmídeo de *E. coli* pBR322, desenvolvido em 1977, é um bom exemplo de um plasmídeo com características úteis em quase todos os vetores de clonagem (Figura 9-3):

1. O plasmídeo pBR322 tem uma **origem de replicação**, ou **ori**, uma sequência onde a replicação é iniciada por enzimas celulares (ver Capítulo 25). Essa sequência é necessária para propagar o plasmídeo. Um sistema regulatório associado limita a replicação para manter o pBR322 em um nível de 10 a 20 cópias por célula.

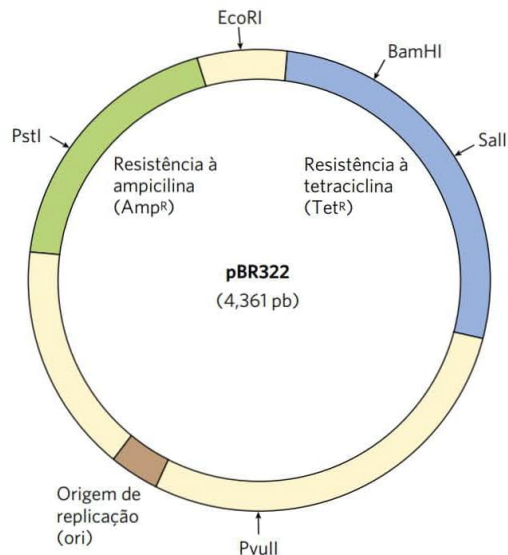


FIGURA 9-3 O plasmídeo construído de *E. coli* pBR322. Observe a localização de alguns sítios de restrição importantes, para PstI, EcoRI, BamHI, Sall e PvuII; genes de resistência à ampicilina e à tetraciclina (*amp^R* e *tet^R*); e a origem de replicação (*ori*). Construído em 1977, este foi um dos plasmídeos expressamente projetados para clonagem em *E. coli*.

2. O plasmídeo contém genes que conferem resistência aos antibióticos tetraciclina (*Tet^R*) e ampicilina (*Amp^R*), permitindo a seleção de células que contêm o plasmídeo intacto ou uma versão recombinante do plasmídeo (discutida a seguir).
3. Várias sequências de reconhecimento únicas no pBR322 são alvo para endonucleases de restrição (PstI, EcoRI, BamHI, Sall e PvuII), fornecendo sítios onde o plasmídeo pode ser cortado para inserção de DNA exógeno.
4. O pequeno tamanho do plasmídeo (4.361 pb) facilita sua entrada nas células e a manipulação bioquímica do DNA. Esse tamanho pequeno foi o resultado da remoção de muitos segmentos de DNA de um plasmídeo original grande – sequências que os biólogos moleculares não precisam.

As origens de replicação inseridas em vetores comuns de plasmídeos foram originalmente derivadas de plasmídeos que ocorrem naturalmente. Como em pBR322, cada uma dessas origens é regulada para manter um número de cópias específico do plasmídeo. Dependendo da origem utilizada, o número de cópias do plasmídeo pode variar de uma a centenas ou milhares por célula, proporcionando muitas opções para os investigadores. Dois plasmídeos diferentes não podem funcionar na mesma célula utilizando a mesma origem de replicação, visto que a regulação de um interferirá com a replicação do outro. Esses plasmídeos são considerados incompatíveis. Quando um pesquisador deseja introduzir dois ou mais plasmídeos diferentes em uma célula bacteriana, cada plasmídeo deve ter uma origem de replicação diferente.

Em laboratório, os plasmídeos pequenos podem ser introduzidos em células bacterianas por um processo chama-

do de **transformação**. As células (frequentemente *E. coli*, mas outras espécies bacterianas são usadas também) e DNA plasmidial são incubados juntos na temperatura de 0°C em uma solução de cloreto de cálcio e, em seguida, submetidos a choque térmico pela mudança brusca de temperatura para entre 37 e 43°C. Por motivos ainda não bem estabelecidos, algumas das células tratadas dessa forma captam o DNA plasmidial. Algumas espécies de bactérias, como o *Acinetobacter baylyi*, são naturalmente competentes na captação do DNA e não necessitam de tratamento com cloreto de cálcio e choque térmico. Em um método alternativo, denominado **eletroporação**, as células incubadas com o DNA plasmidial são submetidas a um pulso elétrico de alta voltagem, o que torna a membrana bacteriana transitoriamente permeável a moléculas grandes.

Independentemente da abordagem, relativamente poucas células captam o DNA plasmidial, de forma que outro método é necessário para identificar aquelas células que captaram o DNA. A estratégia é utilizar um dos dois tipos de genes no plasmídeo, chamados de marcadores de seleção e triagem. Um **marcador de seleção** pode permitir tanto o crescimento de uma célula (seleção positiva) quanto matar a célula (seleção negativa), sob um conjunto definido de condições. O plasmídeo pBR322 permite marcadores para ambas, seleção positiva e seleção negativa (Figura 9-4). Um **marcador de triagem** é um gene que codifica uma proteína que leva a célula a produzir uma molécula colorida ou fluorescente. As células não são prejudicadas quando o gene está presente, e as células que transportam o plasmídeo são facilmente identificadas pelas colônias coloridas ou fluorescentes que produzem.

A transformação de células bacterianas normais com DNA purificado (processo pouco eficaz) torna-se menos bem-sucedida com o aumento do tamanho do plasmídeo, sendo difícil clonar segmentos de DNA maiores do que cerca de 15.000 pb quando plasmídeos são utilizados como o vetor.

Para ilustrar o uso de um plasmídeo como vetor de clonagem, considere o gene bacteriano codificando uma recombinase denominada proteína RecA (ver Capítulo 25). Na maioria das bactérias, o gene que codifica a RecA é um dos milhares de genes em um cromossomo de milhões de pares de bases. O gene *recA* tem um pouco mais de 1.000 pb de comprimento. Um plasmídeo seria uma boa escolha para a clonagem de um gene desse tamanho. Como descrito posteriormente, o gene clonado pode ser modificado de vários modos, e as variantes do gene podem ser expressas em níveis elevados para permitir a purificação da proteína codificada.

Cromossomos artificiais de bactérias Às vezes, os pesquisadores precisam clonar segmentos de DNA muito mais longos do que aqueles que podem ser incorporados nos típicos vetores de clonagem plasmidiais, como o pBR322. Para atender a essa necessidade, foram desenvolvidos vetores plasmidiais com características especiais que permitem a clonagem de segmentos muito longos (normalmente de 100.000 a 300.000 pb) de DNA. Quando esses grandes segmentos de DNA clonado são adicionados, esses vetores são suficientemente grandes para serem considerados cromossomos e são chamados de **cromossomos artificiais bacterianos**, ou **BAC** (Figura 9-5).

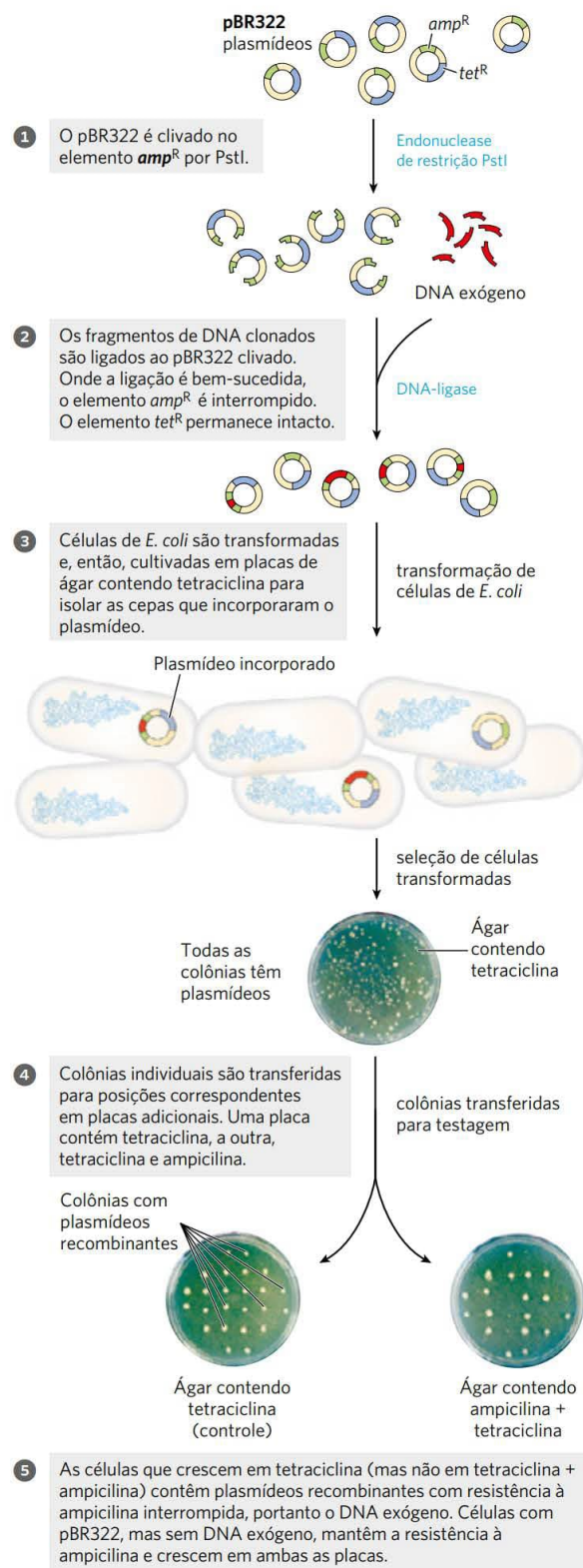
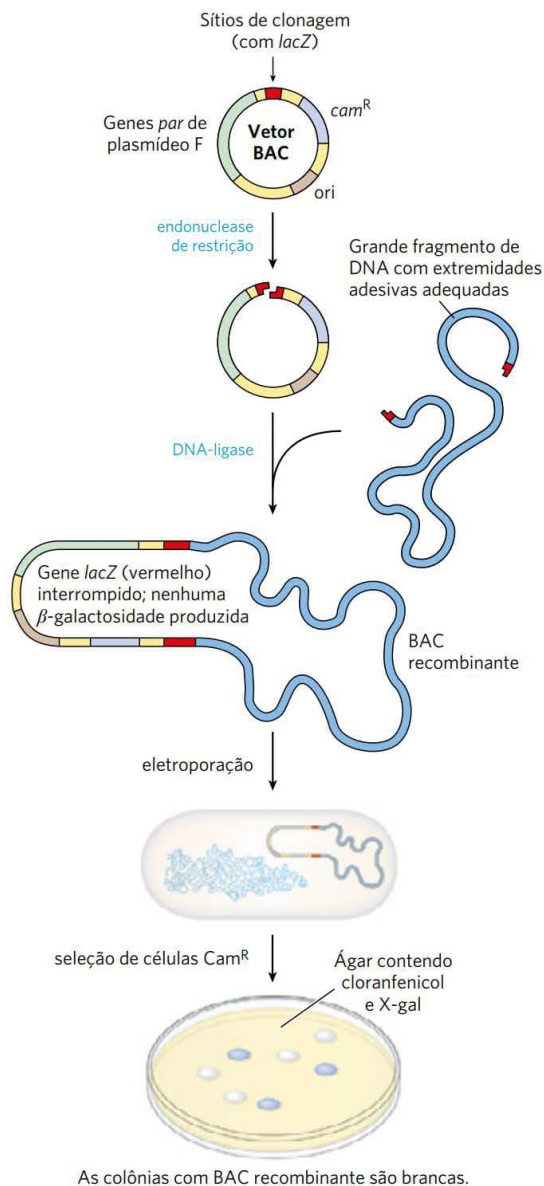


FIGURA 9-4 Utilização do pBR322 para clonar DNA exógeno em *E. coli* e identificar as células contendo esse DNA. [Fonte: Elizabeth A. Wood, University of Wisconsin-Madison, Department of Biochemistry.]

Um vetor BAC (sem qualquer DNA clonado inserido) é um plasmídeo relativamente simples, em geral não muito maior do que outros vetores plasmidiais. Para acomodar segmentos de DNA clonado muito longos, os vetores BAC têm origens estáveis de replicação que mantêm o plasmídeo em uma ou duas cópias por célula. O baixo número de cópias é útil para a clonagem de grandes segmentos de DNA porque limita as oportunidades de reações de recombinação indesejadas que podem, de modo imprevisto, alterar grandes DNAs clonados ao longo do tempo. Os BACs também incluem genes *par* que codificam proteínas, as quais direcionam a distribuição confiável de cromossomos recombinantes para as células-filhas na divisão celular, aumentando, assim, a probabilidade de cada uma delas transportar uma cópia, mesmo quando algumas cópias

estão presentes. O vetor BAC inclui tanto os marcadores de seleção quanto os marcadores de triagem. O vetor BAC mostrado na Figura 9-5 contém um gene que confere resistência ao antibiótico cloranfenicol (Cam^R). As células contendo o vetor podem ser selecionadas pelo seu crescimento em placas de ágar contendo esse antibiótico – seleção positiva, pois somente as células com o vetor conseguem sobreviver. Um gene *lacZ*, necessário para a produção da enzima β -galactosidase, é um marcador de triagem capaz de revelar as células que contêm os plasmídeos – agora cromossomos – que incorporam os segmentos de DNA clonados. A β -galactosidase catalisa a conversão da molécula incolor 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosídeo (X-gal) em um produto azul. Se o gene está intacto e expresso, a colônia que o contém fica azul. Se a expressão gênica está interrompida pela inserção de um segmento de DNA clonado, a colônia é branca.



Cromossomos artificiais de levedura Assim como no caso de *E. coli*, a genética de levedura é uma área de conhecimento bem desenvolvida. O genoma de *Saccharomyces cerevisiae* contém apenas 14×10^6 pb (menos que quatro vezes o tamanho do cromossomo de *E. coli*), e sua sequência inteira é conhecida. A levedura também é muito fácil de ser mantida e cultivada em larga escala em laboratório. Os vetores plasmidiais têm sido bem construídos para serem inseridos em leveduras, aplicando os mesmos princípios que regem o uso de vetores de *E. coli*. Métodos convenientes para mover o DNA para dentro e para fora das leveduras permitem o estudo de muitos aspectos da bioquímica de células eucarióticas. Alguns plasmídeos recombinantes incorporam múltiplas origens de replicação e outros elementos que lhes permitem ser utilizados em mais de uma espécie (p. ex., em leveduras e em *E. coli*). Esses plasmídeos que podem ser propagados em células de duas ou mais espécies são chamados de **vetores shuttle**.

Pesquisas em genomas grandes e a necessidade associada de vetores de clonagem de alta capacidade levaram ao desenvolvimento de **cromossomos artificiais de levedura**.

FIGURA 9-5 Cromossomos artificiais bacterianos (BAC) como vetores de clonagem. O vetor é um plasmídeo relativamente simples, com uma origem de replicação (*ori*) que direciona a replicação. Os genes *par*, derivados de um tipo de plasmídeo chamado de plasmídeo F, auxiliam na distribuição dos plasmídeos para as células-filhas na divisão celular. Isso aumenta a probabilidade de cada célula-filha carregar uma cópia do plasmídeo, mesmo quando poucas cópias estão presentes. O baixo número de cópias é útil na clonagem de grandes segmentos de DNA, uma vez que limita as oportunidades para que reações de recombinação indesejadas possam alterar de modo imprevisto grandes DNAs clonados ao longo do tempo. O BAC inclui marcadores de seleção. Um gene *lacZ* (necessário à produção da enzima β -galactosidase) situa-se na região de clonagem, de modo que ele é inativado pelas inserções de DNA clonado. A introdução de BACs recombinantes nas células por eletroporação é promovida pelo uso de células com uma parede celular alterada (mais porosa). Os DNAs recombinantes são selecionados para resistência para o antibiótico cloranfenicol (Cam^R). As placas também contêm X-gal, um substrato para β -galactosidase que gera um produto azul. As colônias com β -galactosidase ativa e, consequentemente, sem inserto de DNA no vetor BAC, ficam azuis; as colônias sem atividade da β -galactosidase e, portanto, sem os insertos de DNA desejados, permanecem brancas.

dura ou **YACs** (Figura 9-6). Os vetores YAC contêm todos os elementos necessários para manter um cromossomo eucariótico no núcleo da levedura: uma origem de replicação de levedura, dois marcadores de seleção e sequências especializadas (derivadas de telômeros e do centrômero) necessárias para a estabilidade e a segregação adequadas dos cromossomos na divisão celular (ver Capítulo 24). Na preparação para seu uso na clonagem, o vetor é propagado como um plasmídeo bacteriano circular e, então, isolado e purificado. A clivagem com endonuclease de restrição (BamHI na Figura 9-6) remove um segmento do DNA entre duas sequências de telômeros (TEL), deixando os telômeros nas extremidades do DNA linearizado. A clivagem em outro sítio interno (por EcoRI na Figura 9-6) divide o vetor em dois segmentos de DNA, chamados de braços do vetor, cada qual com um marcador de seleção diferente.

O DNA genômico a ser clonado é preparado por digestão parcial com endonucleases de restrição para obter um tamanho de fragmento adequado. Em seguida, os fragmentos genômicos são separados por **eletroforese em gel de campo pulsado**, uma variação da eletroforese em gel (ver Figura 3-18) que separa os segmentos de DNA muito grandes. Os fragmentos de DNA de tamanho adequado (até cerca de 2×10^6 pb) são misturados com os braços do vetor preparado e ligados. A mistura de ligação é, então, utilizada para transformar células (pré-tratadas para degradar parcialmente suas paredes celulares) com essas moléculas de DNA muito grandes – que agora têm estrutura e tamanho para serem consideradas cromossomos de levedura. A cultura em um meio que exige a presença de ambos os genes marcadores de seleção assegura o crescimento somente das células de levedura que contêm um cromossomo artificial com grande inserção colocada entre os dois braços do vetor (Figura 9-6). A estabilidade dos clones YAC aumenta com o comprimento do segmento de DNA clonado (até certo ponto). Aqueles contendo inserções com mais de 150.000 pb são quase tão estáveis quanto cromossomos celulares normais, ao passo que os com inserções de menos de 100.000 pb de comprimento são gradativamente perdidos durante a mitose (portanto, em geral não existe nenhum clone de células de levedura carregando apenas as extremidades de dois vetores ligados juntos ou vetores com apenas inserções curtas). Os YAC sem um telômero em cada uma das extremidades se degradam rapidamente.

Como acontece com os BACs, os vetores YAC podem ser utilizados para clonar segmentos de DNA muito longos. Além disso, o DNA clonado em um YAC pode ser modificado para o estudo de funções de sequências especializadas no metabolismo de cromossomos, mecanismos de regulação e expressão gênica e muitos outros problemas na biologia molecular de eucariotos.

Genes clonados podem ser expressos para amplificar a produção de proteínas

Com frequência, o produto de um gene clonado, mais que o próprio gene, é o interesse principal, sobretudo quando a proteína tem valor comercial, terapêutico ou de pesquisa. Os bioquímicos utilizam proteínas purificadas para muitos fins, incluindo a descoberta do seu funcionamento, o estu-

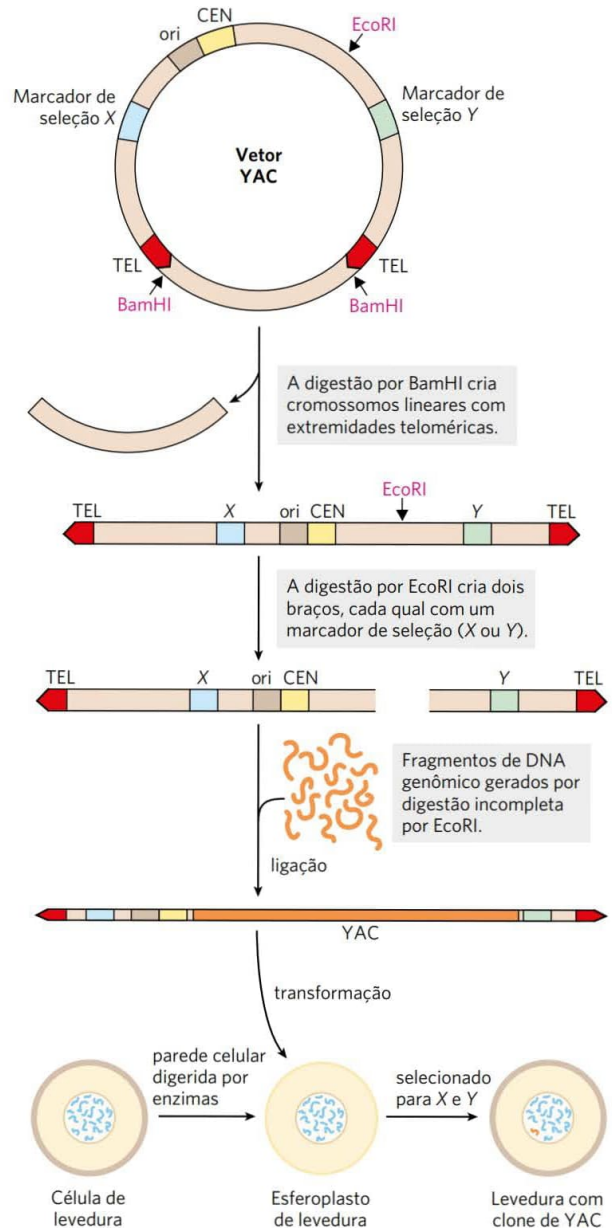


FIGURA 9-6 Construção de um cromossomo artificial de levedura (YAC). Um vetor YAC inclui uma origem de replicação (*ori*), um centrômero (*CEN*), dois telômeros (*TEL*) e marcadores de seleção (*X* e *Y*). A digestão por *Bam*HI e *Eco*RI gera dois braços de DNA separados, cada um com uma extremidade telomérica e um marcador de seleção. Um grande segmento de DNA (p. ex., até 2×10^6 pb de um genoma humano) liga-se aos dois braços para criar um cromossomo artificial de levedura. O YAC transforma as células de levedura (preparadas pela remoção da parede celular para formar esferoplastos), e as células são selecionadas para *X* e *Y*; as células sobreviventes propagam o inserto de DNA.

do de mecanismos de reação, a geração de anticorpos para as proteínas, a reconstituição de atividades celulares complexas no tubo de ensaio com componentes purificados e o exame de parceiros de ligação de proteínas. Com o aumento

da compreensão sobre os fundamentos do metabolismo do DNA, do RNA e das proteínas e sua regulação em um organismo hospedeiro como a *E. coli* ou leveduras, os pesquisadores manipulam células para expressar genes clonados, a fim de estudar seus produtos proteicos. O objetivo geral é modificar as sequências ao redor de um gene clonado para enganar o hospedeiro, a fim de produzir o produto proteico do gene, frequentemente em níveis muito elevados. A superexpressão de uma proteína torna sua purificação subsequente muito mais fácil.

Como exemplo, será utilizada a expressão de uma proteína eucariótica em uma bactéria. Os genes eucarióticos têm sequências circundantes necessárias para sua transcrição e regulação nas células das quais são derivados, mas essas sequências não funcionam em bactérias. Assim, os genes eucarióticos não têm os elementos de sequência de DNA necessários para sua expressão controlada em células bacterianas – promotores (sequências que informam à RNA-polimerase onde se ligar para iniciar a síntese de mRNA), sítios de ligação de ribossomos (sequências que permitem a tradução de mRNA para proteína) e sequências regulatórias adicionais. Portanto, as sequências regulatórias bacterianas adequadas para a transcrição e a tradução devem ser inseridas no vetor de DNA nas posições corretas em relação ao gene eucariótico.

Vetores de clonagem com sinais de transcrição e tradução necessários à expressão regulada de um gene clonado são chamados de **vetores de expressão**. A taxa de expressão do gene clonado é controlada pela substituição do promotor normal e por sequências regulatórias do gene por versões mais eficientes e convenientes fornecidas pelo vetor. Em geral, um promotor bem caracterizado e seus elementos regulatórios são posicionados próximos a vários sítios de restrição exclusivos para a clonagem, de modo que genes inseridos nos sítios de restrição sejam expressos a partir desses elementos do promotor regulado (**Figura 9-7**). Alguns desses vetores incorporam outras características, como um sítio de ligação de ribossomos bacterianos, para potencializar a tradução do mRNA derivado do gene (Capítulo 27) ou uma sequência de terminação da transcrição (Capítulo 26). Em alguns casos, os genes clonados são expressos de maneira tão eficiente que seus produtos proteicos representam 10% ou mais da proteína celular. Nessas concentrações, algumas proteínas estranhas podem matar a célula hospedeira (geralmente *E. coli*); portanto, a expressão do gene clonado deve ser limitada a poucas horas antes da coleta das células.

Muitos sistemas diferentes são utilizados para expressar proteínas recombinantes

Todo organismo vivo tem a capacidade de expressar genes em seu DNA genômico; portanto, em princípio, qualquer organismo pode ser um hospedeiro para expressar proteínas de espécies diferentes (heterólogas). De fato, quase todos os tipos de organismos são utilizados para esse fim, e cada tipo de hospedeiro tem um conjunto próprio de vantagens e desvantagens.

Bactérias As bactérias, sobretudo *E. coli*, são os hospedeiros mais comuns para a expressão de proteínas. As sequências

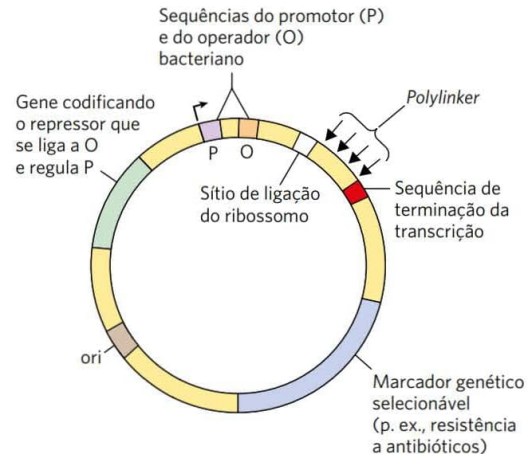


FIGURA 9-7 Sequências de DNA em um típico vetor de expressão de *E. coli*. O gene a ser expresso é inserido em um dos sítios de restrição no polylinker, perto do promotor (P), com a extremidade do gene codificando a terminação amina da proteína posicionada o mais perto possível do promotor. O promotor permite a transcrição eficiente do gene inserido, e a sequência de transcrição-terminação algumas vezes aumenta a quantidade e a estabilidade do mRNA produzido. O operador (O) permite a regulação por um repressor que se liga a ele. O sítio de ligação do ribossomo fornece sinais de sequências para a tradução eficiente do mRNA derivado do gene. O marcador de seleção permite a identificação das células contendo o DNA recombinante.

regulatórias que determinam a expressão gênica em *E. coli* e em muitas outras bactérias são bem compreendidas e podem ser aproveitadas para expressar proteínas clonadas em níveis elevados. As bactérias são fáceis de armazenar e cultivar em laboratório, em meios de cultivo baratos. Também existem métodos eficientes para colocar DNA em bactérias e extrair-lo delas. As bactérias podem ser cultivadas em grandes quantidades em fermentadores comerciais, fornecendo uma rica fonte de proteínas clonadas. Entretanto, existem problemas. Quando expressas em bactérias, algumas proteínas heterólogas não se enovelam corretamente, e muitas não fazem as modificações pós-transacionais ou a clivagem proteolítica necessárias à sua atividade. Devido a certas características de uma sequência gênica, dificilmente um gene específico também se expressa em bactérias. Por exemplo, regiões intrinsecamente desordenadas são mais comuns em proteínas eucarióticas. Quando expressas em bactérias, muitas proteínas eucarióticas se agregam em precipitados celulares insolúveis, chamados de corpos de inclusão. Por essas e muitas outras razões, algumas proteínas eucarióticas são inativas quando purificadas de bactérias ou não podem ser expressas de maneira alguma. Para ajudar a lidar com alguns desses problemas, novas linhagens bacterianas hospedeiras são regularmente desenvolvidas para incluir melhorias, como a introdução de chaperonas proteicas eucarióticas ou de enzimas que modifiquem as proteínas eucarióticas.

Há muitos sistemas especializados para expressar proteínas em bactérias. O promotor e as sequências regulatórias associadas ao operon da lactose (ver Capítulo 28) são, com frequência, fusionados ao gene de interesse para dire-

cionar a transcrição. O gene clonado será transcrito quando a lactose for adicionada ao meio de cultivo. No entanto, a regulação no sistema da lactose é “frouxa”; ela não é desligada completamente quando a lactose está ausente – um problema em potencial se o produto do gene clonado for tóxico para as células hospedeiras. A transcrição a partir do promotor Lac também não é muito eficiente para algumas aplicações.

Um sistema alternativo utiliza o promotor e a RNA-polimerase de um vírus bacteriano denominado bacteriófago T7. Se o gene clonado está fusionado ao promotor T7, ele é transcrito pela RNA-polimerase T7, e não pela RNA-polimerase da *E. coli*. O gene que codifica essa polimerase é clonado separadamente na mesma célula em uma construção que proporciona uma regulação rigorosa (permitindo a produção controlada da RNA-polimerase T7). A polimerase também é muito eficiente e direciona níveis elevados de expressão da maioria dos genes fusionados ao promotor T7. Esse sistema é utilizado para expressar a proteína RecA em células bacterianas (**Figura 9-8**).

Leveduras A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é provavelmente o organismo eucariótico mais bem conhecido e um dos mais fáceis de cultivar e manipular em laboratório. Como as bactérias, essa levedura pode crescer em meios baratos. A levedura tem paredes celulares resistentes, que são difíceis de romper para introduzir vetores de DNA; assim, as bactérias são mais convenientes para fazer a maior parte da engenharia genética e a manutenção de vetores. É por isso que o vetor de leveduras foi propagado pela primeira vez em bactérias. Existem vários excelentes vetores de transporte para esse fim.

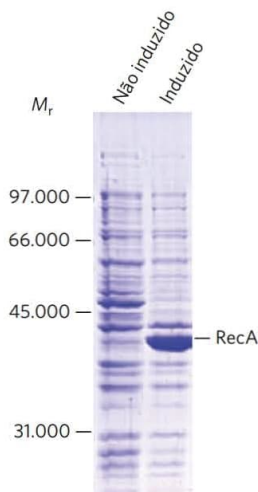


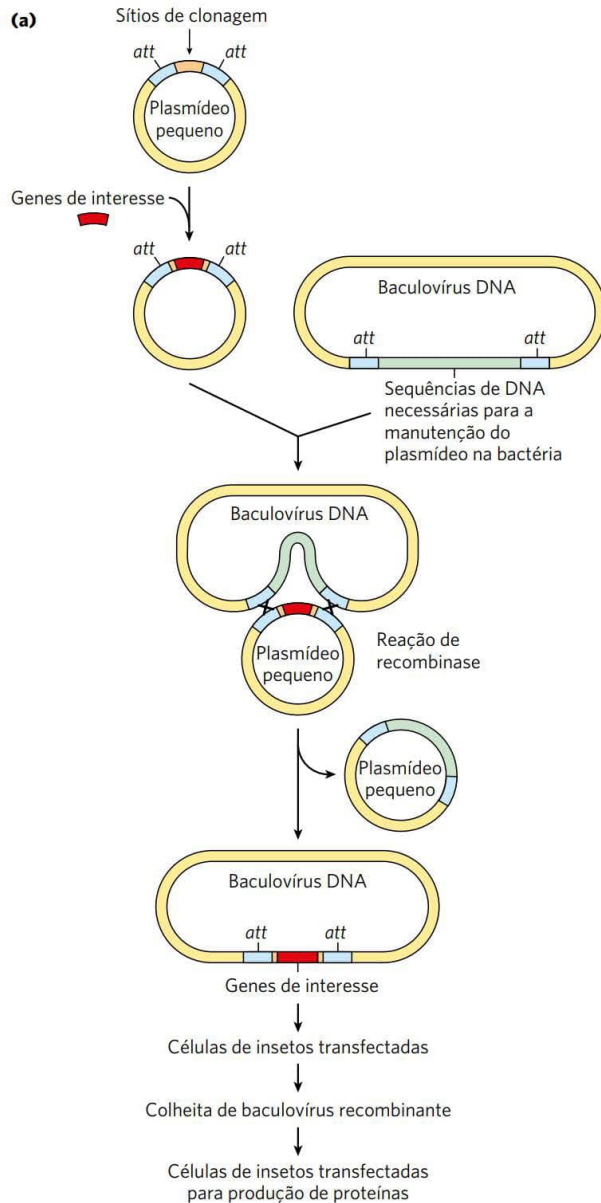
FIGURA 9-8 Expressão regulada da proteína RecA em uma célula bacteriana. O gene que codifica a proteína RecA, fusionado ao promotor T7 do bacteriófago, é clonado em um vetor de expressão. Em condições normais de crescimento (não induzido), nenhuma proteína RecA aparece. Quando a RNA-polimerase de T7 é induzida na célula, o gene *recA* é expresso, e grandes quantidades da proteína RecA são produzidas. As posições dos marcadores de peso molecular padrão que correm no mesmo gel estão indicadas. [Fonte: cortesia de Rachel Britt, Department of Biochemistry, University of Wisconsin-Madison.]

Os princípios subjacentes à expressão de uma proteína em leveduras são os mesmos daqueles para bactérias. Os genes clonados devem estar ligados aos promotores que podem direcionar altos níveis de expressão em leveduras. Por exemplo, os genes da levedura *GAL1* e *GAL10* são regulados pela célula, de modo a serem expressos quando as células da levedura são cultivadas em meios com galactose, mas desligados quando as células são cultivadas em glicose. Assim, se um gene heterólogo é expresso utilizando as mesmas sequências reguladoras, a expressão desse gene pode ser controlada simplesmente pela escolha de um meio adequado para o crescimento celular.

Alguns dos mesmos problemas que acompanham a expressão de proteínas em bactérias também ocorrem com as leveduras. As proteínas heterólogas podem não se enovelar adequadamente, a levedura pode não ter as enzimas necessárias para modificar as proteínas para a sua forma ativa ou a expressão das proteínas pode ser dificultada por certas características da sequência gênica. Entretanto, como o *S. cerevisiae* é um eucarioto, a expressão de genes eucarióticos (principalmente genes de levedura) é, às vezes, mais eficiente nesse hospedeiro do que em bactérias. Os produtos podem ser enovelados e modificados mais fidedignamente do que as proteínas expressas em bactérias.

Insetos e vírus de insetos Os **baculovírus** são vírus de insetos com genomas de DNA de cadeia dupla. Ao infectarem larvas de insetos hospedeiras, agem como parasitas, matando as larvas e transformando-as em fábricas de produção de vírus. Mais tarde no processo de infecção, os vírus produzem grandes quantidades de duas proteínas (p10 e poliedrina), mas nenhuma delas é necessária para a produção de vírus em células de insetos cultivados. Os genes para ambas as proteínas podem ser substituídos pelo gene de uma proteína heteróloga. Quando o vírus recombinante resultante é utilizado para infectar células ou larvas de insetos, a proteína heteróloga é frequentemente produzida em níveis muito elevados – até 25% do total de proteínas presentes no final do ciclo de infecção.

O nucleopoliedrovírus multicapsídeo que infecta *Autographa californica* (AcMNPV) é o baculovírus mais usado para expressão de proteínas. Ele tem um genoma grande demais (134.000 pb) para a clonagem direta. A purificação de vírus também é complicada. Esses problemas foram resolvidos com a criação de **bacmídeos**, DNAs circulares grandes que incluem todo o genoma do baculovírus, além das sequências que permitem a replicação do bacmídeo em *E. coli* (**Figura 9-9**). O gene de interesse é clonado em um plasmídeo menor e combinado com o plasmídeo maior por recombinação sítio-específica *in vivo* (ver Figura 25-38). O bacmídeo recombinante é então isolado e transfectado para as células de insetos (o termo **transfecção** é utilizado quando o DNA utilizado para a transformação inclui sequências virais e leva à replicação viral), seguido pela recuperação da proteína assim que termina o ciclo de infecção. Uma grande variedade de sistemas de bacmídeos encontra-se disponível comercialmente. Os sistemas de baculovírus não são bem-sucedidos com todas as proteínas. Entretanto, às vezes, as células de insetos com esses sistemas replicam com sucesso os padrões de modificação de proteína de eucariotos supe-



(b)



Larva não infectada

Larva infectada
com um baculovírus

FIGURA 9-9 Clonagem com baculovírus. (a) Aqui é mostrada a construção de um vetor típico utilizado para a expressão de proteínas em baculovírus. O gene de interesse está clonado em um plasmídeo pequeno (superior, à esquerda) entre dois sítios (*att*) reconhecidos pela recombinase sítio-específica, sendo, em seguida, introduzido no vetor do baculovírus por recombinação sítio-específica (ver Figura 25-38). Isso gera um produto de DNA circular utilizado para infectar as células de uma larva de inseto. O gene de interesse é expresso durante o ciclo de infecção, depois de um promotor que normalmente expressa uma proteína de revestimento de baculovírus em níveis muito elevados. (b) As fotografias mostram larvas da mariposa de repolho. A larva à direita foi infectada com um vetor baculovírus recombinante expressando uma proteína que produz a cor vermelha; à esquerda, uma larva não infectada. [Fonte: (b) USDA-ARS.]

riores e produzem proteínas eucarióticas ativas corretamente modificadas.

Células de mamíferos em cultura A forma mais conveniente de introduzir genes clonados em células de mamíferos é por meio de vírus. Esse método tem a vantagem de utilizar a capacidade natural de um vírus para inserir seu DNA ou RNA em uma célula e, por vezes, no cromossomo celular. Diversos vírus de mamíferos geneticamente modificados estão disponíveis como vetores, incluindo adenovírus e retrovírus humanos. O gene de interesse é clonado, de modo que a sua expressão seja controlada por um promotor do vírus. O vírus utiliza seus mecanismos de infecção naturais para introduzir o genoma recombinante nas células, onde a proteína clonada é expressa. Esses sistemas têm a vantagem de as proteínas serem expressas transitoriamente (se o DNA viral for mantido separadamente a partir do genoma da célula hospedeira e, por fim, degradado) ou permanentemente (se o DNA viral for integrado no genoma da célula hospedeira). Com a escolha correta da célula hospedeira, a modificação pós-traducional adequada da proteína para sua forma ativa pode ser assegurada. Entretanto, o crescimento de células de mamíferos em culturas de tecidos é muito caro, e essa tecnologia é geralmente utilizada para testar a função de uma proteína *in vivo*, em vez de produzir uma proteína em grandes quantidades.

A alteração de genes clonados produz proteínas alteradas

Técnicas de clonagem podem ser usadas não apenas para superprodução de proteínas, mas para produzir proteínas alteradas sutil ou drasticamente a partir das suas formas nativas. Aminoácidos específicos podem ser substituídos individualmente por **mutagênese sítio-dirigida**. Essa técnica melhorou substancialmente as pesquisas sobre proteínas, ao permitir que os investigadores façam alterações específicas na estrutura primária e analisem os efeitos dessas alterações no enovelamento, na estrutura tridimensional e na atividade proteica. Essa abordagem poderosa para estudar a estrutura e a função das proteínas muda a sequência de aminoácidos pela alteração da sequência de DNA do gene clonado. Se os sítios de restrição adequados se situam ao lado da sequência a ser alterada, os pesquisadores podem simplesmente remover um segmento de DNA e substituí-lo por um sintético idêntico ao original, exceto para a mudança desejada (**Figura 9-10a**).

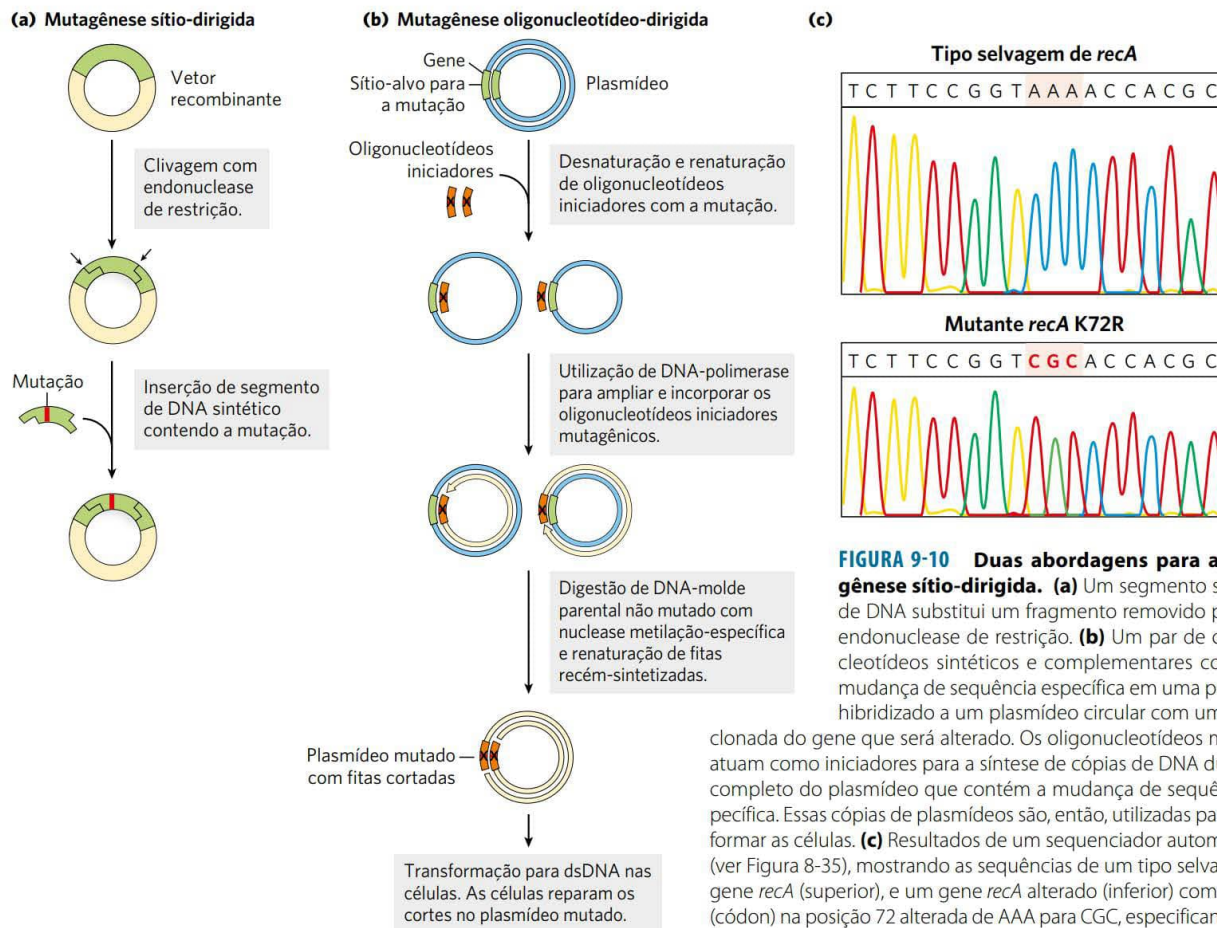


FIGURA 9-10 Duas abordagens para a mutagenese sítio-dirigida. (a) Um segmento sintético de DNA substitui um fragmento removido por uma endonuclease de restrição. (b) Um par de oligonucleotídeos sintéticos e complementares com uma mudança de sequência específica em uma posição é hibridizado a um plasmídeo circular com uma cópia

clonada do gene que será alterado. Os oligonucleotídeos mutados atuam como iniciadores para a síntese de cópias de DNA dupla-fita completo do plasmídeo que contém a mudança de sequência específica. Essas cópias de plasmídeos são, então, utilizadas para transformar as células. (c) Resultados de um sequenciador automatizado (ver Figura 8-35), mostrando as sequências de um tipo selvagem de gene *recA* (superior), e um gene *recA* alterado (inferior) com a trinca (códon) na posição 72 alterada de AAA para CGC, especificando uma Arg (R), em vez de um resíduo Lys (K). [Fonte: (c) Elizabeth A. Wood, University of Wisconsin-Madison, Department of Biochemistry.]

Na ausência de sítios de restrição adequadamente localizados, a **mutagenese oligonucleotídeo-dirigida** pode criar uma alteração específica na sequência de DNA (Figura 9-10b). O gene clonado é desnaturado, separando as fitas. Duas cadeias de DNA curtas complementares, cada uma com a alteração de base desejada, são renaturadas em cadeias opostas do gene clonado dentro de um vetor de DNA circular adequado. O malpareamento de um único par de base em 30 a 40 pb não impede a renaturação. Os dois oligonucleotídeos renaturados sintetizam o primeiro DNA em ambas as direções ao redor do vetor de plasmídeo, criando duas fitas complementares que contêm a mutação. Depois de vários ciclos de amplificação seletiva pela reação em cadeia da polimerase (PCR; ver Figura 8-33), o DNA contendo a mutação predomina na população e pode ser usado para transformar bactérias. A maior parte das bactérias transformadas terá plasmídeos portadores da mutação. Se necessário, o molde do DNA do plasmídeo não mutante pode ser eliminado seletivamente por clivagem com a enzima de restrição DpnI. O plasmídeo-molde, geralmente isolado a partir de um tipo selvagem de *E. coli*, tem um resíduo A metilado em cada cópia do palíndromo de quatro nucleotídeos GATC (chamado de sítio dam; ver Figura 25-21). O novo DNA con-

tendo a mutação não tem resíduos A metilados porque a replicação é realizada *in vitro*. Considerando que DpnI cliva seletivamente DNA somente na sequência GATC, ela quebra apenas a fita-molde se o resíduo A em uma ou ambas as fitas está metilado.

Para exemplificar, voltaremos para o gene *recA* bacteriano. O produto desse gene, a proteína RecA, tem várias atividades (ver Seção 25.3): ela se liga e forma uma estrutura filamentosa no DNA, alinha dois DNAs de sequências semelhantes e hidrolisa ATP. Um resíduo de aminoácido específico na RecA (polipeptídeo de 352 resíduos), o resíduo Lys na posição 72, está envolvido na hidrólise do ATP. Alterando o Lys⁷² para uma Arg, uma variante da proteína RecA é criada e se ligará, mas não hidrolisará o ATP (Figura 9-10c). A engenharia e a purificação dessa proteína variante RecA têm facilitado a investigação quanto aos papéis da hidrólise do ATP no funcionamento dessa proteína.

Alterações podem ser introduzidas em genes que envolvam mais de um par de bases. Grandes partes de um gene podem ser excluídas cortando-se um segmento com endonucleases de restrição e ligando-se as porções remanescentes para formar um gene menor. Por exemplo, se uma proteína tem dois domínios, o segmento do gene que codifica

um dos domínios pode ser removido, de forma que o gene possa agora codificar uma proteína com apenas um dos dois domínios originais. Partes dos dois genes diferentes podem ser ligadas para criar novas combinações; o produto desse gene fusionado é chamado de **proteína de fusão**. Os pesquisadores têm métodos engenhosos para realizar praticamente qualquer alteração genética *in vitro*. Após a reintrodução do DNA alterado na célula, eles investigam as consequências dessa alteração.

Marcadores terminais fornecem instrumentos para a purificação por afinidade

A cromatografia por afinidade é um dos métodos mais eficientes para a purificação de proteínas (ver Figura 3-17c). Infelizmente, muitas proteínas não se ligam a um ligante que possa ser convenientemente imobilizado em uma matriz adequada para montar uma coluna. Entretanto, o gene para quase todas as proteínas pode ser alterado para expressar uma proteína de fusão purificada por cromatografia de afinidade. O gene que codifica a proteína-alvo é fusionado com um gene que codifica um peptídeo ou proteína que se liga a um ligante simples e estável, com elevada afinidade e especificidade. O peptídeo ou proteína utilizado para essa finalidade é denominado **marcador**. As sequências dos marcadores são adicionadas a genes, de modo que as proteínas resultantes tenham marcadores em seu grupo amino ou carboxiterminal. A Tabela 9-3 lista alguns dos peptídeos ou proteínas comumente utilizados como marcadores.

O procedimento geral pode ser ilustrado analisando-se um sistema que utiliza a glutathione-S-transferase (GST) (Figura 9-11). A GST é uma enzima pequena (M_r 26.000) que se liga firme e especificamente à glutathione. Quando a sequência do gene de GST é fusionada ao gene-alvo, a proteína de fusão adquire a capacidade de se ligar à glutathione. A proteína de fusão é expressa em um organismo hospedeiro, como uma bactéria, e um extrato bruto é preparado. Uma coluna é preenchida com matriz porosa, que consiste em um ligante (glutathione) imobilizado por esferas micros-

cópicas de um polímero reticulado estável, como a agarose. À medida que o extrato bruto se infiltra por essa matriz, a proteína de fusão é imobilizada por sua ligação à glutathione. As outras proteínas no extrato são lavadas e descartadas da coluna. A interação entre GST e glutathione é firme, porém não covalente, permitindo que a proteína de fusão seja eluída suavemente da coluna com uma solução que contém alta concentração de sais ou de glutathione livre para competir com o ligante imobilizado pela ligação com a GST. A proteína de fusão é obtida muitas vezes com bom rendimento e alta pureza. Em alguns sistemas disponíveis comercialmente, o marcador pode ser removido total ou amplamente da proteína de fusão purificada por uma protease que cliva uma sequência próxima da junção entre a proteína-alvo e o marcador.

Um marcador mais curto, com ampla aplicação, consiste em uma sequência simples de seis ou mais resíduos de His. Esses marcadores de histidina, ou marcadores His, ligam-se firme e especificamente aos íons de níquel. A matriz da cromatografia com íons de Ni^{+2} imobilizados pode ser utilizada para separar rapidamente uma proteína marcada com His de outras proteínas no extrato. Alguns dos marcadores maiores, como a proteína de ligação à maltose, proporcionam estabilidade e solubilidade adicionais, permitindo a purificação de proteínas clonadas que, de outro modo, seriam inativas devido ao enovelamento inadequado ou insolubilidade.

A cromatografia de afinidade utilizando marcadores terminais é um método poderoso e conveniente. Os marcadores têm sido utilizados com sucesso em milhares de estudos publicados; em muitos casos, seria impossível purificar e estudar a proteína sem o marcador. Entretanto, mesmo os marcadores muito pequenos afetam as propriedades das proteínas ligadas a eles, de modo a influenciar os resultados do estudo. Por exemplo, um marcador pode atrapalhar o enovelamento de proteínas. Mesmo se o marcador for removido por uma protease, um ou alguns resíduos de aminoácidos adicionais podem permanecer na proteína-alvo, afetando ou não a atividade da proteína. Os tipos de experimentos a serem realizados e os resultados obtidos a partir deles devem ser sempre avaliados com o auxílio de controles bem planejados para avaliar o efeito de um marcador no funcionamento de uma proteína.

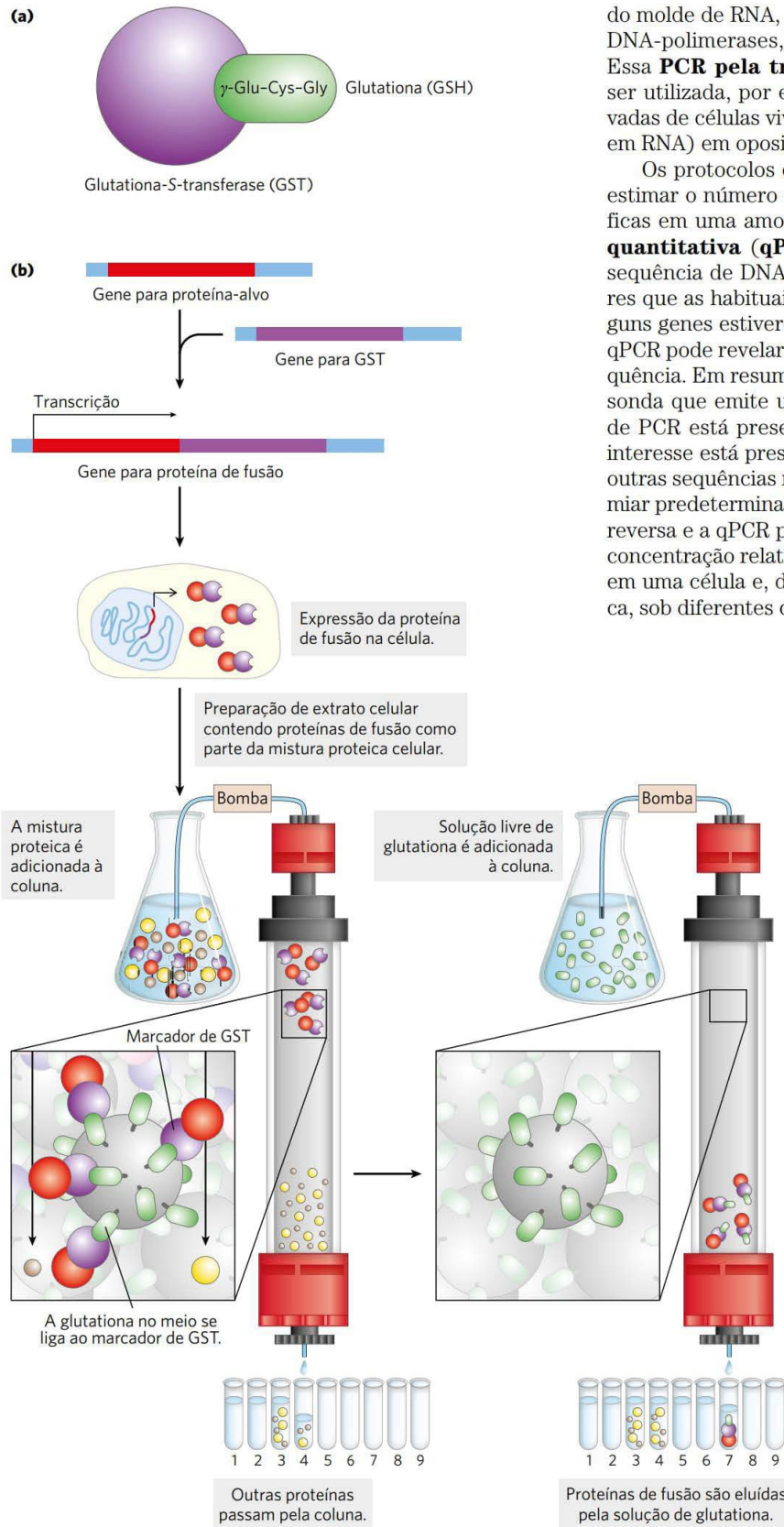
TABELA 9-3 Caudas proteicas comumente usadas

Marcadores proteicos/ peptídicos	Massa molecular (kDa)	Ligante imobilizado
Proteína A	59	Porção Fc da IgG
(His) ₆	0,8	Ni^{+2}
Glutathione-S-transferase (GST)	26	Glutathione
Proteína ligante de maltose	41	Maltose
β -Galactosidase	116	<i>p</i> -Aminofenil- β - D-tiogalactosídeo (TPEG)
Domínio ligante de quitina	5,7	Quitina

A reação em cadeia da polimerase pode ser adaptada para clonagem adequada

O planejamento cuidadoso dos *primers* usados para PCR (ver Figura 8-33) pode modificar o segmento amplificado pela inclusão, em cada extremidade, de um DNA adicional que não estava no cromossomo que está servindo de alvo. Por exemplo, sítios de clivagem para endonucleases de restrição podem ser incluídos para facilitar a posterior clonagem do DNA amplificado (Figura 9-12).

Muitas adaptações adicionais da PCR têm aumentado a sua aplicabilidade. Por exemplo, as sequências no RNA podem ser amplificadas se o primeiro ciclo de PCR utilizar a transcriptase reversa, uma enzima que funciona como uma DNA-polimerase (ver Figura 8-33), mas utiliza o RNA como molde (Figura 9-12). Após a síntese da fita de DNA a partir



do molde de RNA, os ciclos restantes podem ser feitos com DNA-polimerases, utilizando protocolos-padrão de PCR. Essa **PCR pela transcriptase reversa (RT-PCR)** pode ser utilizada, por exemplo, para detectar seqüências derivadas de células vivas (que fazem a transcrição de seu DNA em RNA) em oposição a tecidos mortos.

Os protocolos de PCR podem também ser usados para estimar o número de cópias relativo de seqüências específicas em uma amostra, uma abordagem denominada **PCR quantitativa (qPCR)** ou **PCR em tempo real**. Se uma seqüência de DNA estiver presente em quantidades maiores que as habituais em uma amostra – por exemplo, se alguns genes estiverem aumentados em células tumorais –, a qPCR pode revelar o aumento da representação daquela seqüência. Em resumo, a PCR é realizada na presença de uma sonda que emite um sinal fluorescente quando o produto de PCR está presente (**Figura 9-13**). Se a seqüência de interesse está presente em níveis mais elevados do que em outras seqüências na amostra, o sinal de PCR atingirá um limiar predeterminado mais rápido. A PCR pela transcriptase reversa e a qPCR podem ser combinadas para determinar a concentração relativa de uma molécula de mRNA específica em uma célula e, dessa forma, monitorar a expressão gênica, sob diferentes condições ambientais.

FIGURA 9-11 Utilização de proteínas marcadas na purificação de proteínas.

(a) A glutathione-S-transferase (GST) é uma enzima pequena que liga glutathione (resíduo de glutamato no qual o dipeptídeo Cys-Gly está ligado ao carbono da carboxila da cadeia lateral do Glu, por isso sua abreviação GSH). **(b)** O marçador de GST está fusionado à carboxila terminal da proteína por meio de engenharia genética. A proteína marcada é expressa na célula e está presente no extrato bruto quando as células são lisadas. O extrato é submetido à cromatografia de afinidade (ver Figura 3-17c) em uma matriz com glutathione imobilizada. A proteína marcada com GST se liga à glutathione, retardando a migração da proteína através da coluna, ao passo que as demais proteínas são lavadas rapidamente. Depois, a proteína marcada é eluída com uma solução contendo uma concentração elevada de sal ou de glutathione livre.

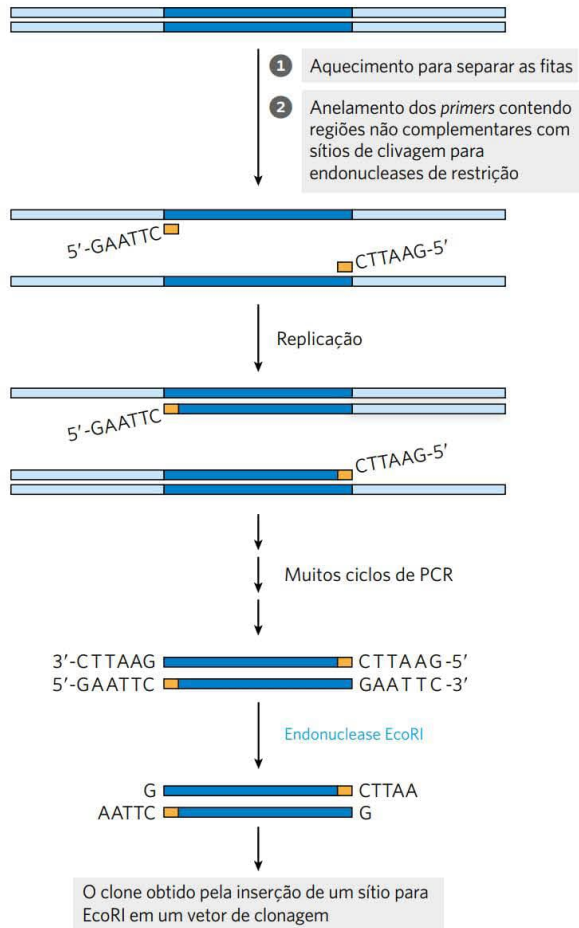


FIGURA 9-12 Clonagem de um segmento de DNA amplificado pela PCR. O DNA que foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (ver Figura 8-33) pode ser clonado. Os oligonucleotídeos iniciadores podem incluir extremidades não complementares que tenham um sítio para clivagem por uma endonuclease de restrição. Embora essas partes dos oligonucleotídeos iniciadores não se anelem ao DNA-alvo, o processo de PCR os incorpora no DNA que é amplificado. A clivagem dos fragmentos amplificados nesses sítios cria as extremidades coesivas, utilizadas na ligação do DNA amplificado com o vetor de clonagem.

RESUMO 9.1 Estudo dos genes e de seus produtos

- A clonagem do DNA e a engenharia genética envolvem a clivagem do DNA e o conjunto de segmentos de DNA em novas combinações – DNA recombinante.
- A clonagem envolve cortar o DNA em fragmentos com enzimas; selecionar e possivelmente modificar um fragmento de interesse; inserir o fragmento de DNA em um vetor de clonagem adequado; transferir o vetor com o DNA inserido em uma célula hospedeira para a replicação; e identificar e selecionar células que contêm o fragmento de DNA.
- Enzimas essenciais na clonagem gênica incluem endonucleases de restrição (principalmente as enzimas tipo II) e a DNA-ligase.
- Vetores de clonagem incluem plasmídeos e, para as inserções de DNA mais longas, cromossomos artificiais de

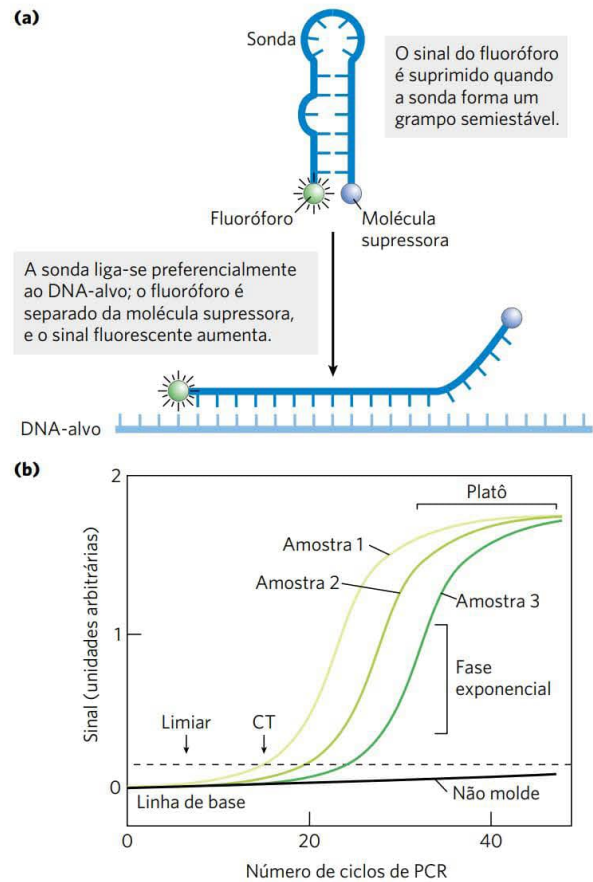


FIGURA 9-13 PCR quantitativa. A PCR pode ser usada quantitativamente, pelo monitoramento cuidadoso do progresso da amplificação da PCR e determinando quando um segmento de DNA foi amplificado para um limiar específico. (a) A quantidade de produto de PCR presente é determinada pela medida do nível da sonda fluorescente ligada a um oligonucleotídeo repórter complementar ao segmento de DNA que está sendo amplificado. A sonda fluorescente não é detectada inicialmente porque um supressor de fluorescência está ligado no mesmo oligonucleotídeo. Quando o oligonucleotídeo repórter se anela com sua sequência complementar em uma cópia do segmento de DNA amplificado, o fluoróforo separa-se da molécula supressora, e a fluorescência aparece. (b) À medida que prossegue a reação de PCR, a quantidade de segmento de DNA-alvo aumenta exponencialmente, e o sinal fluorescente também aumenta exponencialmente à medida que as sondas de oligonucleotídeos se anelam aos segmentos amplificados. Após vários ciclos de PCR, o sinal alcança um platô à medida que um ou mais componentes da reação se extinguem. Quando um segmento está presente em quantidades maiores em uma amostra do que em outra, sua amplificação atinge um limiar predefinido mais cedo. A linha “Não molde” segue o lento aumento do sinal de fundo observado em um controle em que não foi adicionado amostra de DNA. CT é o número de ciclos no qual o limiar é ultrapassado primeiro.

bactérias (BAC) e cromossomos artificiais de leveduras (YAC).

- As técnicas de engenharia genética manipulam células para expressar e/ou alterar genes clonados.
- As proteínas ou peptídeos podem se ligar a uma proteína de interesse alterando o seu gene clonado, criando

uma proteína de fusão. Os segmentos de peptídeos adicionais podem ser utilizados para detectar a proteína ou purificá-la utilizando métodos de cromatografia de afinidade convenientes.

- A reação em cadeia da polimerase (PCR) permite a amplificação de segmentos escolhidos de DNA ou RNA para clonagem e podem ser adaptados para determinar o número de cópias de um gene ou para monitorar quantitativamente a expressão gênica.

9.2 Utilização de métodos com base no DNA para a compreensão das funções das proteínas

A função das proteínas pode ser descrita em três níveis. A **função fenotípica** descreve os efeitos de uma proteína em todo o organismo. Por exemplo, a perda de proteínas pode levar a um crescimento mais lento do organismo, a uma alteração no padrão de desenvolvimento ou até mesmo à morte do organismo. A **função celular** é a descrição de uma rede de interações em que as proteínas participam no nível celular. A identificação de interações com outras proteínas na célula pode ajudar a definir os tipos de processos metabólicos nos quais a proteína participa. Finalmente, a **função molecular** refere-se à atividade bioquímica precisa de uma proteína, incluindo detalhes, como as reações que uma enzima catalisa ou os ligantes que se ligam a um receptor. O desafio de compreender as funções de milhares de proteínas não caracterizadas ou mal caracterizadas encontradas em uma célula típica originou uma grande variedade de técnicas. Os métodos com base no DNA são uma contribuição fundamental para esse esforço e fornecem informações em todos os três níveis. Com essas tecnologias, é possível determinar quando uma proteína específica é expressa, outras proteínas que possam estar relacionadas a ela, sua localização na célula, outros componentes celulares que interagem com ela e o que acontece com a célula quando essa proteína está ausente.

Bibliotecas de DNA são catálogos especializados de informação genética

Uma **biblioteca de DNA** é uma coleção de clones de DNA, geralmente reunidos para fins de descoberta de genes ou para a determinação de um gene ou função de uma proteína. A biblioteca pode ter diversas formas, dependendo da fonte de DNA e do propósito final da biblioteca.

A maior é uma **biblioteca genômica**, produzida quando o genoma completo de um organismo é clivado em milhares de fragmentos. Todos os fragmentos são clonados por inserção de cada fragmento em um vetor de clonagem. Isso cria uma mistura complexa de vetores recombinantes, cada um com um fragmento clonado diferente. A construção da biblioteca começa com a digestão *parcial* do DNA por endonucleases de restrição, de forma que qualquer sequência apareça em fragmentos de uma gama limitada de tamanhos – uma faixa de tamanho compatível com o vetor de clonagem. Os fragmentos muito grandes ou muito pequenos para a clonagem são removidos por centrifugação ou eletroforese. O vetor de clonagem, como BAC ou YAC,

é clivado com a mesma endonuclease de restrição utilizada para digerir o DNA e ligado aos fragmentos de DNA genômico. A mistura de DNA ligado é, então, utilizada para transformar células bacterianas ou de leveduras para produzir uma biblioteca de células, cada qual abrigando uma molécula diferente de DNA recombinante. Idealmente, todo o DNA do genoma em estudo é representado na biblioteca. Cada célula bacteriana ou de levedura transformada cresce em uma colônia ou clone de células idênticas, cada célula contendo o mesmo plasmídeo recombinante, um dos muitos representados na biblioteca total.

Os esforços para definir a função de um gene ou proteína muitas vezes utilizam bibliotecas mais especializadas. Um exemplo é uma biblioteca que inclui apenas as sequências de DNA *expressas* – isto é, transcritas em um RNA – em determinado organismo, ou mesmo em apenas algumas células ou tecidos. Essa biblioteca não tem DNA genômico que não é transcrito. Em primeiro lugar, o pesquisador extrai o mRNA de um organismo ou de células específicas de um organismo e, em seguida, prepara os **DNAs complementares (cDNA)**. Essa reação em múltiplas etapas, mostrada na **Figura 9-14**, depende da transcriptase reversa, a qual sintetiza DNA a partir de um molde de RNA. Os fragmentos de DNA de cadeia dupla resultantes são inseridos em um vetor adequado e clonados, criando uma população de clones, chamada de **biblioteca de cDNA**. A presença de um gene de uma proteína específica nessa biblioteca implica que esse gene é expresso nas células e nas condições usadas para produzir a biblioteca.

Sequências ou relações estruturais fornecem informações sobre a função das proteínas

Uma razão importante para se sequenciar muitos genomas é fornecer um banco de dados capaz de atribuir funções de genes por comparações do genoma, empreendimento conhecido como **genômica comparativa**. Essa área está altamente enraizada e associada à biologia evolutiva. Algumas vezes, um gene recém-descoberto é associado por homologia de sequência a genes estudados previamente em outra ou na mesma espécie, e sua função pode ser total ou parcialmente definida por essa relação. Os genes que ocorrem em espécies diferentes, mas têm uma sequência e uma relação funcional clara entre si, são chamados de **ortólogos**. Os genes que têm semelhança entre si em uma única espécie são chamados de **parálogos**. Esses termos foram introduzidos no Capítulo 3, no contexto de proteínas. Assim como as proteínas, informações sobre a função de um gene em uma espécie podem ser usadas, pelo menos em princípio, para atribuir uma função para o gene ortólogo encontrado em uma segunda espécie. A correlação é mais fácil de ser feita quando se comparam genomas de espécies com relativa proximidade, como camundongos e seres humanos, embora muitos genes claramente ortólogos foram identificados em espécies tão distantes quanto as bactérias e os seres humanos. Algumas vezes, até mesmo a ordem dos genes em um cromossomo é conservada ao longo de grandes segmentos de genomas de espécies estreitamente relacionadas (**Figura 9-15**). A ordem gênica conservada, chamada de **sintenia**, fornece evidência adicional para uma relação ortóloga

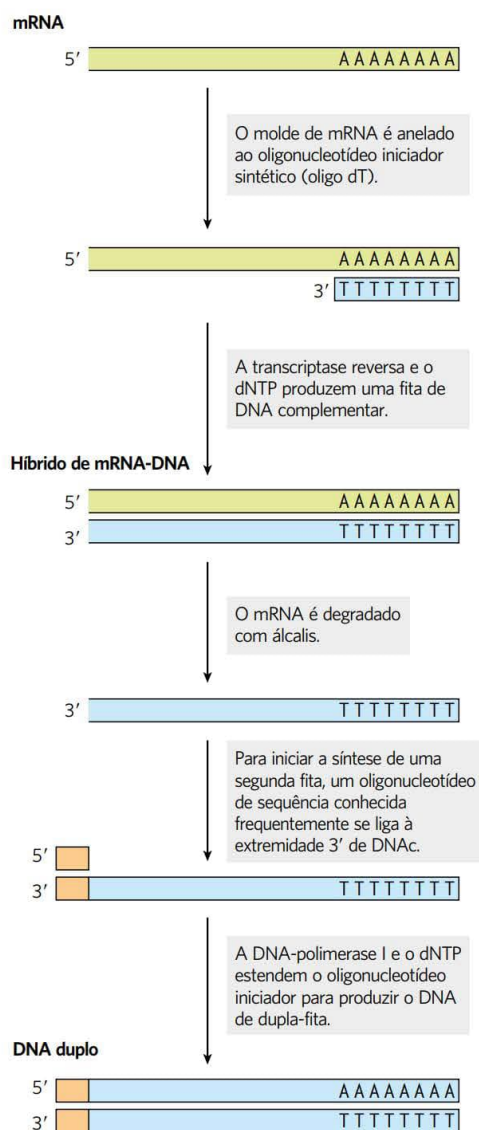


FIGURA 9-14 Construindo uma biblioteca de cDNA a partir de mRNA. O conteúdo total de mRNA de uma célula inclui os transcritos de milhares de genes, e os cDNAs gerados desse mRNA são correspondentemente heterogêneos. A transcriptase reversa pode sintetizar DNA a partir de um RNA ou a partir de um DNA-molde de DNA (ver Figura 26-32). Para iniciar a síntese da segunda fita de DNA, os oligonucleotídeos de sequência conhecida se anelam à extremidade 3' da primeira fita e o cDNA de dupla-fita então produzido é clonado em um plasmídeo.

entre genes em locais idênticos dentro dos segmentos relacionados.

De modo alternativo, certas sequências de aminoácidos associadas com motivos estruturais específicos (Capítulo 4) podem ser identificadas em uma proteína. A presença de um motivo estrutural pode ajudar a definir a função molecular, sugerindo que uma proteína, por exemplo, catalisa a hidrólise de ATP, liga-se ao DNA ou forma um complexo com íons de zinco. Essas relações são determinadas com a ajuda de programas de computador sofisticados, limitados

Cromossomo 9 de ser humano	Cromossomo 2 de camundongo
<i>EPB72</i>	<i>Epb7.2</i>
<i>PSMB7</i>	<i>Psmb7</i>
<i>DNM1</i>	<i>Dnm</i>
<i>LMX1B</i>	<i>Lmx1b</i>
<i>CDK9</i>	<i>Cdk9</i>
<i>STXBP1</i>	<i>Stxbp1</i>
<i>AK1</i>	<i>Ak1</i>
<i>LCN2</i>	<i>Lcn2</i>

FIGURA 9-15 Sintonia em genomas humanos e de camundongos.

Segmentos grandes dos dois genomas têm genes intimamente relacionados alinhados na mesma ordem nos cromossomos. Nesses segmentos curtos do cromossomo 9 humano e do cromossomo 2 de camundongo, os genes exibem alto grau de homologia, assim como a mesma ordem dos genes. Os diferentes esquemas de letras para os nomes dos genes simplesmente refletem as diferentes convenções de nomenclatura nas duas espécies. [Fonte: informação de T. G. Wolfsberg et al., *Nature* 409:824, 2001, Fig. 1.]

apenas pela informação atual sobre a estrutura do gene e da proteína e pela capacidade para associar sequências com motivos estruturais determinados. As sequências no sítio ativo de enzima que foram altamente conservadas durante a evolução estão geralmente associadas à função catalítica, e sua identificação é, muitas vezes, um passo fundamental na definição do mecanismo de reação de uma enzima. O mecanismo de reação, por sua vez, fornece informações úteis para desenvolver novos inibidores de enzimas que podem ser utilizados como agentes farmacêuticos.

Proteínas de fusão e imunofluorescência podem revelar a localização de proteínas em células

Muitas vezes, uma pista importante para a função do produto de um gene surge da determinação da sua localização dentro da célula. Por exemplo, uma proteína que se encontra exclusivamente no núcleo pode estar envolvida em processos exclusivos dessa organela, como transcrição, replicação ou condensação da cromatina. Com frequência, pesquisadores modificam geneticamente proteínas de fusão com a finalidade de localizar uma proteína na célula ou organismo. Algumas das fusões mais úteis são a ligação de proteínas marcadoras que sinalizam a localização por visualização direta ou por imunofluorescência.

Um marcador particularmente útil é a **proteína fluorescente verde (GFP)** (Figura 9-16), descoberta por Osamu Shimomura. Como mostrado posteriormente por Martin Chalfie, um gene-alvo (que codifica a proteína de interesse) fusionado com o gene GFP gera uma proteína de fusão que é altamente fluorescente – ela literalmente acende quando exposta à luz azul – e pode ser visualizada diretamente em uma célula viva. GFP é uma proteína derivada da água-viva *Aequorea victoria*. A proteína tem uma estrutura em barril β com um fluoróforo (o componente fluorescente da proteína) no centro. O fluoróforo é derivado de um rearranjo e oxidação de três resíduos de aminoácidos. Como esta reação é autocatalítica e não requer proteínas ou cofatores além do oxigênio molecular, GFP é facilmente clonada de forma ativa em quase qualquer célula. Apenas algumas moléculas dessa

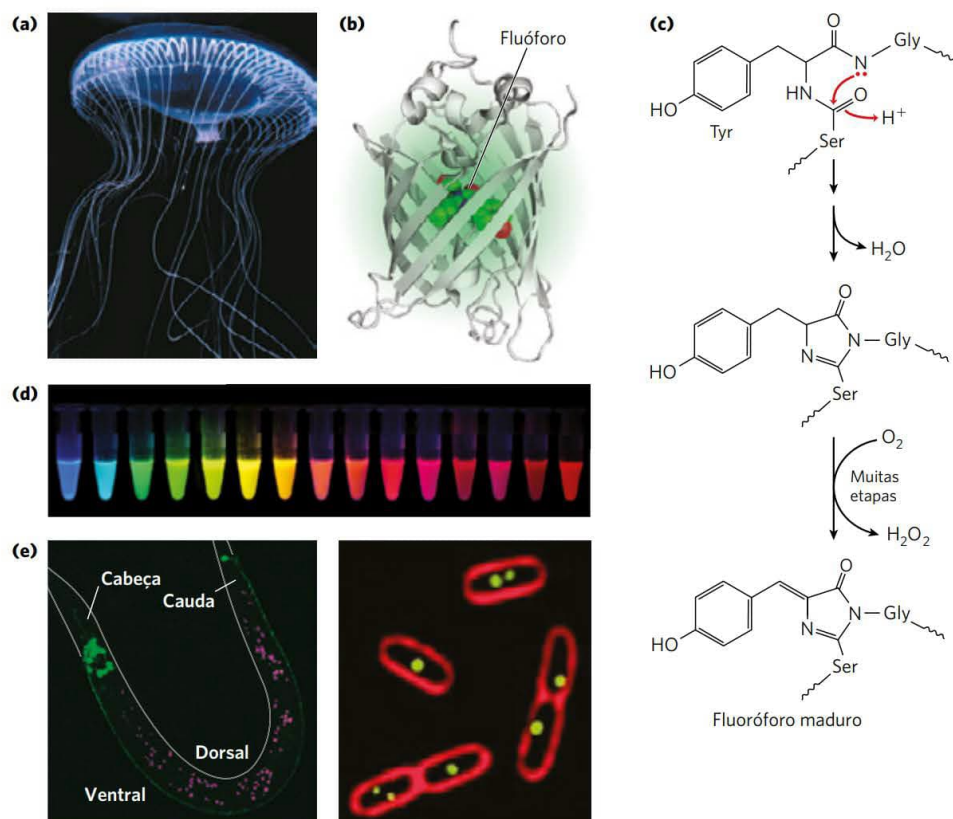


FIGURA 9-16 Proteína fluorescente verde (GFP). (a) GFP é derivada da água-viva *Aequorea victoria*, a qual é abundante em Puget Sound, Washington. (b) A proteína tem uma estrutura em barril β ; o fluoróforo (mostrado no modelo de volume atômico) está no centro do barril. (c) O fluoróforo na GFP é derivado de uma sequência de três aminoácidos: –Ser⁶⁵–Tyr⁶⁶–Gly⁶⁷–. Ele atinge sua forma madura através de um rearranjo interno, acoplado a uma reação de oxidação de várias etapas. Um mecanismo resumido está mostrado aqui. (d) Atualmente, variantes de GFP estão disponíveis em quase todas as cores do espectro visível. (e) Uma proteína de fusão GLR1–GFP tem brilho fluorescente verde brilhante no verme nematódeo *Caenorhabditis elegans* (à esquerda). A GLR1 é um receptor de glutamato do tecido nervoso. (Nessa fotografia, gotículas de gordura autofluorescentes se coloreem falsamente de magenta.) As membranas das células de *E. coli* (à direita) estão coradas com corante fluorescente vermelho. As células estão expressando uma proteína que se liga a um plasmídeo da célula, fusionado com GFP. Os pontos verdes indicam as posições dos plasmídeos. [Fontes: (a) Chris Parks/ImageQuest Marine. (b) PDB ID 1GFL, F. Yang et al., *Nature Biotechnol.* 14:1246, 1996. (c, d) Cortesia de Roger Tsien, University of California, San Diego, Department of Pharmacology, e Paul Steinbach. (e) (à esquerda) Cortesia de Penelope J. Brockie e Andres V. Maricq, Department of Biology, University of Utah; (à direita) cortesia de Joseph A. Pogliano, de J. Pogliano et al. (2001), Multicopy plasmids are clustered and localized in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:4486–4491.]

proteína podem ser observadas ao microscópio, permitindo o estudo de sua localização e movimentos em uma célula. A engenharia proteica cuidadosa de Roger Tsien, juntamente com o isolamento de proteínas fluorescentes relacionadas de outros celenterados marinhos, disponibilizou variantes dessas proteínas em uma variedade de cores (Figura 9-16d) e outras características (brilho, estabilidade). Se a fusão com GFP não prejudica a função ou as propriedades da proteína que se deseja estudar, a proteína de fusão pode ser usada para revelar a localização da proteína na célula em uma série de condições e para detectar interações com outras proteínas marcadas. Com essa tecnologia, por exemplo, a proteína GLR1 (receptor de glutamato do tecido nervoso) foi visualizada como proteína de fusão GLR1–GFP no nematódeo *Caenorhabditis elegans* (Figura 9-16c). Shimomura, Chalfie e Tsien receberam, em 2008, o Prêmio Nobel em Química

pelo trabalho deles no desenvolvimento de GFP como uma ferramenta para pesquisa biomédica.



Osamu Shinomura
[Fonte: Josh Reynolds/
AP Images.]

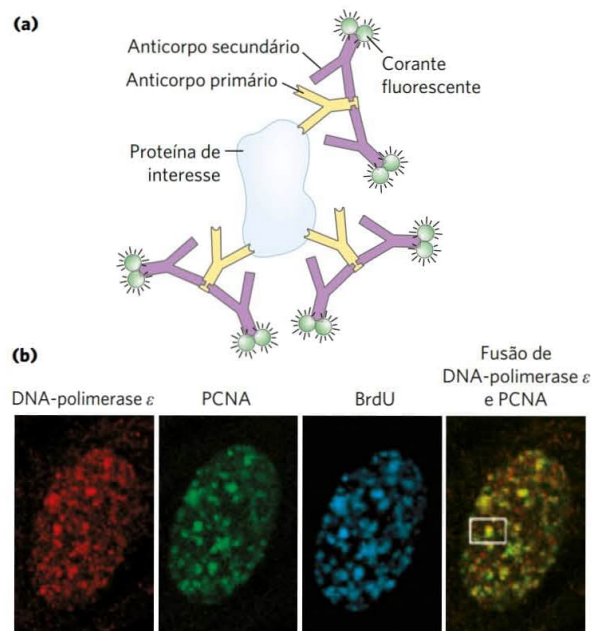


Martin Chalfie
[Fonte: Diane
Bondareff/AP Images.]



Roger Y. Tsien
[Fonte: HO/Reuters/
Corbis.]

FIGURA 9-17 Imunofluorescência indireta. (a) A proteína de interesse liga-se ao anticorpo primário, e um anticorpo secundário é adicionado; este segundo anticorpo, com um ou mais grupos fluorescentes ligados, liga-se ao primeiro. Muitos anticorpos secundários podem se ligar ao anticorpo primário, amplificando o sinal. Se a proteína de interesse está no interior de uma célula, a célula é fixada e permeabilizada, e os dois anticorpos são adicionados sucessivamente. (b) O resultado é uma imagem na qual os pontos brilhantes indicam a localização da proteína, ou proteínas, de interesse na célula. As imagens mostram um núcleo de um fibroblasto humano, sucessivamente corado com anticorpos e marcadores fluorescentes para DNA-polimerase ϵ , para PCNA, importante proteína acessória da polimerase, e para bromodesoxiuridina (BrdU), análogo de nucleotídeo. A BrdU, adicionada como um breve pulso, identifica as regiões de replicação ativa de DNA. Os padrões de coloração mostram que a DNA-polimerase ϵ e a PCNA se colocam em regiões de síntese ativa de DNA (imagem mais à direita); uma dessas regiões é visível no quadro branco. [Fonte: (b) Fuss, J. e Linn, S., 2002, "Human DNA polymerase ϵ colocalizes with proliferating cell nuclear antigen and DNA replication late, but not early, in S phase," *J. Biol. Chem.* 277, 8658-8666. Cortesia de Jill Fuss, University of California, Berkeley.]



focos de luz em células que expressam o gene em níveis suficientes – supondo que a proteína de fusão mantenha sua função e localização normais.

Interações proteína-proteína ajudam a elucidar a função proteica

Outra chave para definir a função de uma determinada proteína é determinar com quais outros componentes celulares ela se liga. No caso de interações proteína-proteína, a associação de uma proteína de função desconhecida com uma cuja função é conhecida pode fornecer uma implicação convincente de uma relação funcional. As técnicas utilizadas nesse esforço são bastante variadas.

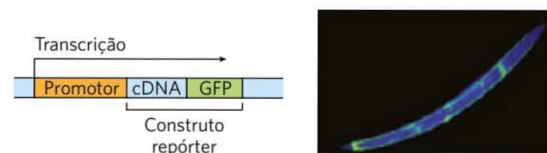


FIGURA 9-18 Bibliotecas especializadas de DNA. A clonagem de um cDNA próximo ao gene de GFP cria um construto repórter. A transcrição prossegue por meio do gene de interesse (o cDNA inserido) e o gene repórter (aqui, o de GFP), e o transcrito de mRNA é expresso como uma proteína de fusão. Parte da proteína GFP é visível ao microscópio com fluorescência. Apenas um exemplo é mostrado aqui; milhares de genes podem ser fusionados com a GFP em construções similares e armazenados em bibliotecas em que cada célula ou organismo na biblioteca expressa uma proteína diferente fusionada à GFP. Se a proteína de fusão for devidamente expressa, os pesquisadores podem avaliar sua localização na célula ou organismo. A fotografia mostra um nematódeo contendo uma proteína de fusão GFP expressa apenas nos quatro neurônios "de toque" que percorrem o comprimento do corpo. [Fonte: cortesia de Kevin Strange, PhD, e Michael Christensen, PhD, Department of Pharmacology, Vanderbilt University Medical Center.]

Em muitos casos, a visualização de uma proteína de fusão GFP em uma célula viva não é possível, prática ou mesmo desejável. A proteína de fusão GFP pode estar inativa ou pode não ser expressa em níveis suficientes para permitir a visualização. Nesse caso, a **imunofluorescência** é um método alternativo para a visualização da proteína endógena (inalterada). Esta abordagem requer fixação (e, portanto, morte) da célula. A proteína de interesse é algumas vezes expressa como uma proteína de fusão com um **marcador de epítipo**, sequência proteica curta que se liga firmemente a um anticorpo bem caracterizado e disponível comercialmente. As moléculas fluorescentes (fluorocromos) estão ligadas a esse anticorpo. Mais comumente, a proteína-alvo é inalterada e está ligada por um anticorpo que é específico para a proteína. Em seguida, um segundo anticorpo é adicionado e se liga especificamente ao primeiro, e é o segundo anticorpo que tem o(s) fluorocromo(s) ligado(s) (**Figura 9-17a**). Uma variação dessa abordagem indireta para a visualização é ligar moléculas de biotina ao primeiro anticorpo e, em seguida, adicionar estreptavidina (uma proteína bacteriana intimamente relacionada à avidina, uma proteína que se liga à biotina; ver Tabela 5-1) complexada com fluorocromos. A interação entre a biotina e a estreptavidina é uma das interações mais fortes e mais específicas conhecidas, e o potencial de adicionar muitos fluorocromos em cada proteína-alvo confere a esse método uma grande sensibilidade. Em todos estes casos, o produto é uma visão microscópica de uma célula em que um ponto de luz (um foco) revela a localização da proteína.

Bibliotecas de cDNA altamente especializadas podem ser feitas por clonagem de cDNA ou de fragmentos de cDNA em um vetor que se funde a cada sequência de cDNA com a sequência para um marcador, chamado de gene repórter. O gene fusionado é frequentemente chamado de construto repórter. Por exemplo, todos os genes na biblioteca podem ser fusionados com o gene da GFP (**Figura 9-18**). Cada célula na biblioteca expressa um desses genes fusionados. A localização celular do produto de qualquer gene representado na biblioteca é revelada como

Purificação de complexos proteicos Ao fundir o gene que codifica uma proteína em estudo com o gene para uma etiqueta de epítipo, os pesquisadores podem precipitar o produto proteico do gene de fusão por complexação com o anticorpo que liga o epítipo. Esse processo é chamado **imunoprecipitação (Figura 9-19)**. Se a proteína marcada é expressa em células, outras proteínas que se ligam a ela também precipitam com ela. A identificação de proteínas associadas revela algumas das interações proteína-proteína da proteína marcada. Há muitas variações desse processo. Por exemplo, um extrato bruto de células que expressa uma proteína marcada é adicionado a uma coluna contendo anticorpos imobilizados (ver Figura 3-17c para uma descrição de cromatografia de afinidade). A proteína marcada liga-se ao anticorpo e, às vezes, proteínas que interagem com a proteína marcada também são retidas na coluna. A conexão entre a proteína e o marcador é clivada com uma protease específica, e os complexos de proteínas são eluídos da coluna e analisados. Os pesquisadores utilizam esses métodos para

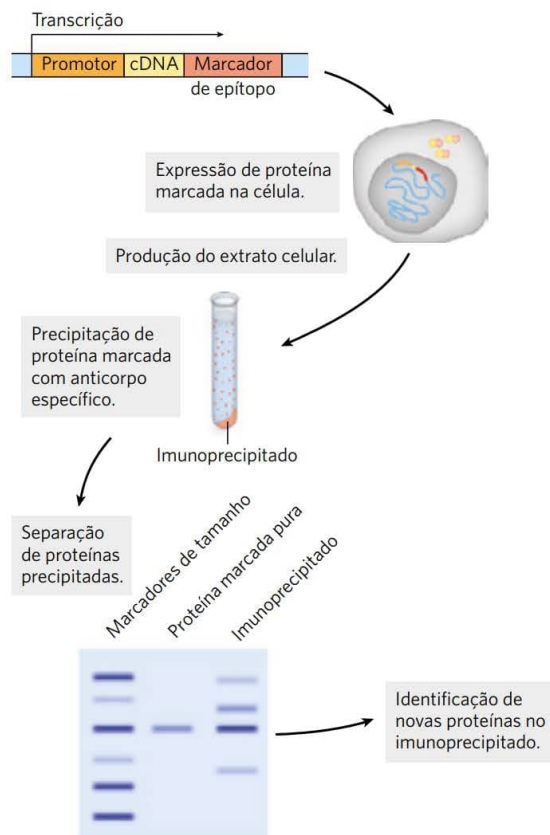


FIGURA 9-19 O uso de marcadores de epítipos para estudar interações proteína-proteína. O gene de interesse é clonado próximo a um gene para um marcador de epítipo, e a proteína de fusão resultante é precipitada por anticorpos para o epítipo. Todas as outras proteínas que interagem com a proteína marcada também precipitam, contribuindo, assim, para elucidar as interações proteína-proteína.

definir redes complexas de interações no interior de uma célula. Em princípio, o método cromatográfico para analisar interações proteína-proteína é utilizado com qualquer tipo de marcador de proteína (marcador His, GST, etc.) que possa ser imobilizado em meio cromatográfico adequado.

A seletividade desse método foi potencializada com os **marcadores de purificação por afinidade em tandem (TAP)**. Dois marcadores consecutivos são fusionados a uma proteína-alvo, e a proteína de fusão é expressa em uma célula (**Figura 9-20**). O primeiro marcador é a proteína A, encontrada na superfície da bactéria *Staphylococcus aureus* que se liga firmemente à imunoglobulina G (IgG) de mamíferos. O segundo marcador é frequentemente um peptídeo de ligação à calmodulina. Um extrato bruto contendo

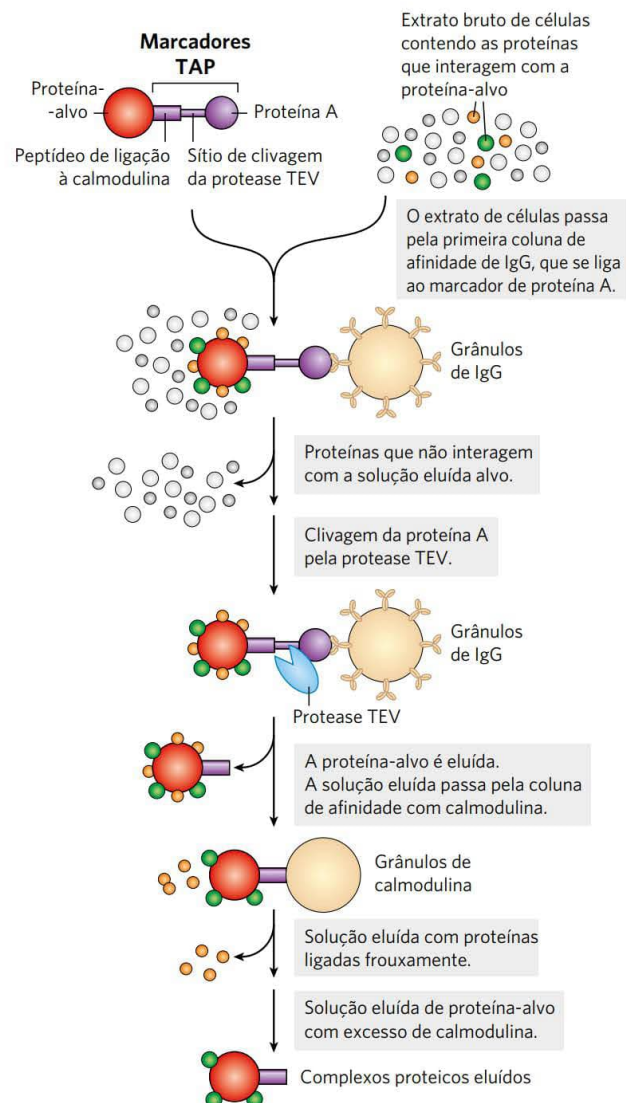


FIGURA 9-20 Marcadores por purificação de afinidade em tandem (TAP). Uma proteína marcada com TAP e proteínas associadas são isoladas por duas purificações de afinidade consecutivas, conforme descrito no texto.

a proteína de fusão marcadora de TAP é passado por uma matriz de coluna com anticorpos IgG fixados que se ligam à proteína A. A maior parte das proteínas celulares não ligadas é lavada pela coluna, mas as proteínas que normalmente interagem com a proteína-alvo na célula são retidas. O primeiro marcador é, então, clivado a partir da proteína de fusão com uma protease altamente específica, a protease TEV, e a proteína-alvo de fusão encurtada e quaisquer outras proteínas associadas de modo não covalente à proteína-alvo são eluídas da coluna. O eluente, então, passa por uma segunda coluna contendo uma matriz com calmodulina fixada, que liga o segundo marcador. Proteínas ligadas frouxamente voltam a ser lavadas ao longo da coluna. Após a clivagem do segundo marcador, a proteína-alvo é eluída ao longo da coluna com suas proteínas associadas. As duas etapas de purificação consecutivas eliminam todos os contaminantes fracamente ligados. Falsos-positivos são minimizados, e as interações proteicas que persistem em ambas as etapas podem ser funcionalmente significativas.

Análise de duplos-híbridos em leveduras Uma abordagem genética sofisticada para definir interações proteína-proteína está baseada nas propriedades da proteína Gal4 (Gal4p; ver Figura 28-31), a qual ativa a transcrição dos genes *GAL* (codificando as enzimas do metabolismo da galactose) em leveduras. A Gal4p tem dois domínios: um que se liga a uma sequência específica de DNA e outro que ativa a RNA-polimerase para sintetizar mRNA a partir de um gene adjacente. Os dois domínios de Gal4p são estáveis quando separados, mas a ativação da RNA-polimerase exige a interação com o domínio de ativação, que, por sua vez, necessita de posicionamento próximo do domínio de ligação do DNA. Assim, os dois domínios devem ser reunidos para funcionar corretamente.

Na **análise de duplo-híbrido em leveduras**, as regiões gênicas codificadoras de proteínas analisadas são fusionadas ao gene da levedura tanto ao domínio de ligação do DNA quanto ao domínio de ativação de Gal4p, e os genes resultantes expressam várias proteínas de fusão. (**Figura 9-21**). Se uma proteína fusionada ao domínio de ligação do DNA interage com uma proteína fusionada ao domínio de ativação, a transcrição é ativada. O gene repórter transcrito por essa ativação é geralmente o que produz uma proteína necessária para o cultivo ou uma enzima que catalisa uma reação com um produto colorido. Desse modo, quando cultivadas em meio adequado, as células que contêm um par de proteínas em interação são facilmente distinguidas das células que não o têm. Uma biblioteca pode ser configurada com uma linhagem de levedura específica, na qual cada célula na biblioteca tem um gene fusionado com o gene do domínio de ligação do DNA de Gal4p, e muitos desses genes estão representados na biblioteca. Em uma segunda linhagem de leveduras, um gene de interesse é fusionado com o gene para o domínio de ativação de Gal4p. As linhagens de leveduras são colocadas para se reproduzir, e as células diploides individuais são cultivadas em colônias. As únicas células que crescem no meio seletivo e produzem a cor adequada são aquelas em que o gene de interesse está ligado a um parceiro, permitindo a transcrição do gene repórter. Isso permite a triagem em larga escala de proteínas celulares que interagem com a proteína-alvo. A proteína de

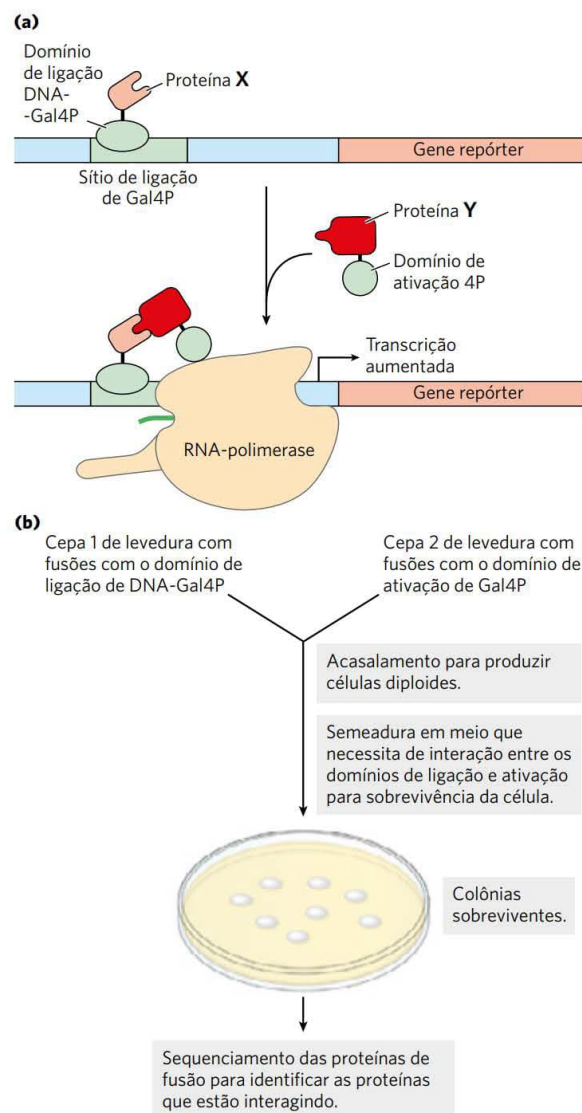


FIGURA 9-21 Análise de duplo-híbrido em leveduras. (a) O objetivo é reunir o domínio de ligação do DNA e o domínio de ativação da proteína de levedura Gal4 (Gal4p) pela interação de duas proteínas, X e Y, à qual um dos domínios se funde. Esta interação é acompanhada pela expressão de um gene repórter. (b) As duas fusões de genes são criadas em linhagens de leveduras separadas, sendo, então, colocadas para reproduzir. A mistura que sofre reprodução é semeada em um meio em que as leveduras não podem sobreviver a menos que o gene repórter seja expresso. Assim, todas as colônias sobreviventes têm proteínas de fusão interagindo. O sequenciamento das proteínas de fusão nas colônias sobreviventes revela quais proteínas estão interagindo.

interação, fusionada com o domínio de ligação do DNA de Gal4p, presente em uma determinada colônia selecionada, pode ser rapidamente identificada por sequenciamento de DNA do gene da proteína de fusão. Alguns resultados falso-positivos ocorrem devido à formação de complexos multi-proteicos.

Essas técnicas para a determinação da localização celular e das interações moleculares fornecem pistas importantes sobre a função proteica. Entretanto, elas não substituem

a bioquímica clássica, simplesmente fornecem aos pesquisadores um acesso rápido a novos e importantes problemas biológicos. Quando combinadas com as ferramentas da bioquímica e biologia molecular que evoluem simultaneamente, as técnicas aqui descritas aceleram a descoberta não apenas de novas proteínas, mas de novos processos e mecanismos biológicos.

Microarranjos de DNA revelam padrões de expressão de RNA e outras informações

Os principais refinamentos da tecnologia subjacente de bibliotecas de DNA, PCR e hibridização se uniram no desenvolvimento de **microarranjos de DNA**, os quais permitem a triagem rápida e simultânea de muitos milhares de genes. Na técnica mais utilizada, os segmentos de DNA de genes de sequência conhecida, de algumas dúzias a centenas de pares de bases, são sintetizados diretamente em uma superfície sólida por meio de um processo chamado de fotolitografia (**Figura 9-22**). Milhares de sequências independentes são geradas, cada uma ocupando uma parte minúscula, ou ponto, de uma superfície que mede apenas alguns centímetros quadrados. O padrão de sequências é pré-designado, com cada um dos muitos milhares de manchas contendo sequên-

cias derivadas de um gene específico. A matriz resultante, ou *chip*, pode incluir sequências derivadas de cada gene de um genoma bacteriano ou de levedura, ou famílias selecionadas de genes de um genoma maior quando construído, o microarranjo pode ser hibridizado com mRNA ou cDNA a partir de um determinado tipo celular ou cultura de células para identificar os genes que são expressos nessas células.

Um microarranjo pode fornecer um panorama de todos os genes de um organismo, informando ao pesquisador sobre os genes expressos em determinada fase do desenvolvimento de um organismo ou em um conjunto particular de condições ambientais. Por exemplo, o complemento total de mRNA pode ser isolado a partir de células em duas fases diferentes de desenvolvimento e convertido a cDNA com transcriptase reversa. Com o uso de desoxirribonucleotídeos marcados com fluorescência, duas amostras de cDNA podem ser sintetizadas, sendo uma fluorescente vermelha e a outra verde (**Figura 9-23**). O cDNA das duas amostras é misturado e hibridizado com o microarranjo. Cada cDNA se anela a um ponto apenas, correspondendo ao gene que codifica o mRNA que originou o cDNA. Pontos que apresentam fluorescência verde representam genes que produzem mRNA em níveis mais elevados em

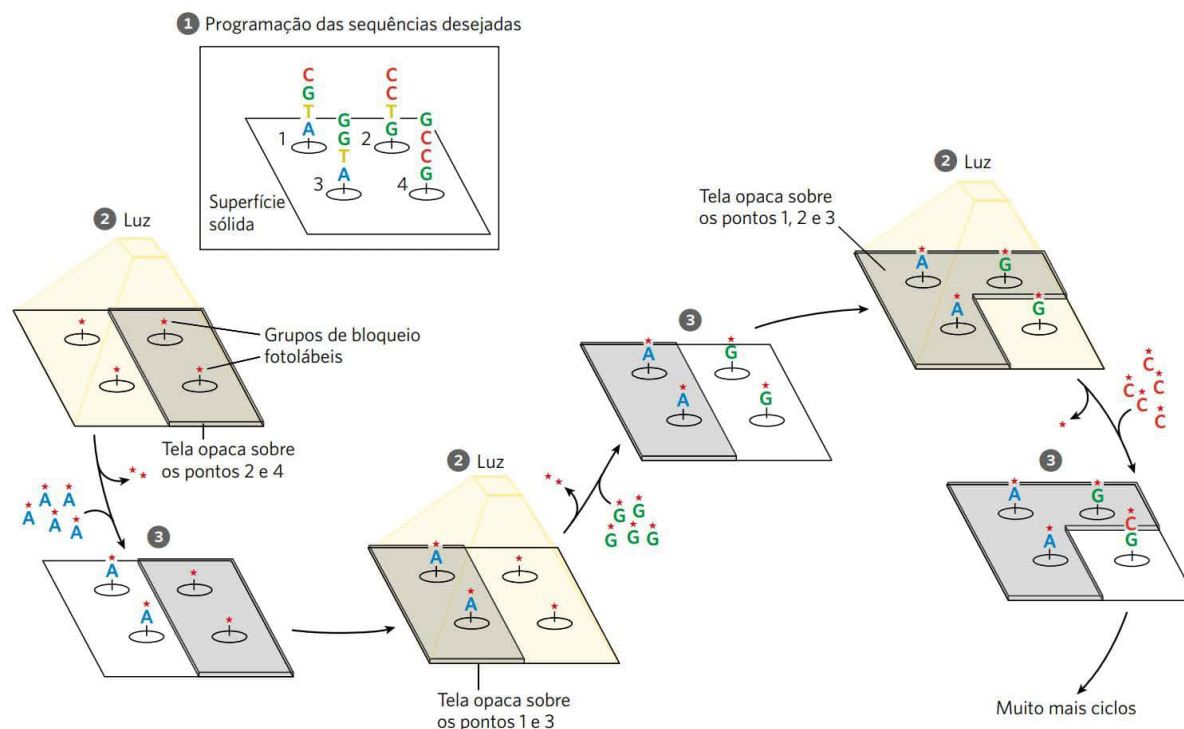


FIGURA 9-22 Fotolitografia para criar um microarranjo de DNA. ❶ Um computador é programado com as sequências de oligonucleotídeos desejadas. Grupos nucleofílicos, ligados a uma superfície sólida, são inicialmente inativados por grupos de bloqueio fotolábeis (mostrados aqui como *). ❷ Antes de um *flash* de luz, uma tela opaca bloqueia a luz de algumas áreas da superfície, impedindo sua ativação. Outras áreas, ou "pontos", são expostas. ❸ Uma solução contendo um nucleotídeo de fosforamidato fotoprotetido no grupo 5' (p. ex., A*) é lavada sobre os pontos. O grupo 5' hidroxila do nucleotídeo é bloqueado com o grupo fotolábil (*) para evitar reações indesejadas, e o nucleotídeo liga-se aos grupos nucleofílicos da superfície exposta, nos locais apropriados por deslocamento do seu 3' fosforamidato ativado. A superfície é lavada sucessivamente com soluções contendo cada nucleotídeo restante (G*, C*, T*), com cada lavagem precedida por um *flash* de luz para remover os grupos de bloqueio fotolábeis de nucleotídeos ou grupos de superfície nos locais apropriados (etapas ❷ e ❸, repetidas). São adicionados nucleotídeos adicionais, um de cada vez, para estender o oligonucleotídeo nascente, usando telas e luz para garantir que os nucleotídeos corretos sejam adicionados em cada ponto na sequência correta. O processo é repetido até que as sequências necessárias sejam construídas em cada um dos milhares de pontos em um microarranjo de DNA.

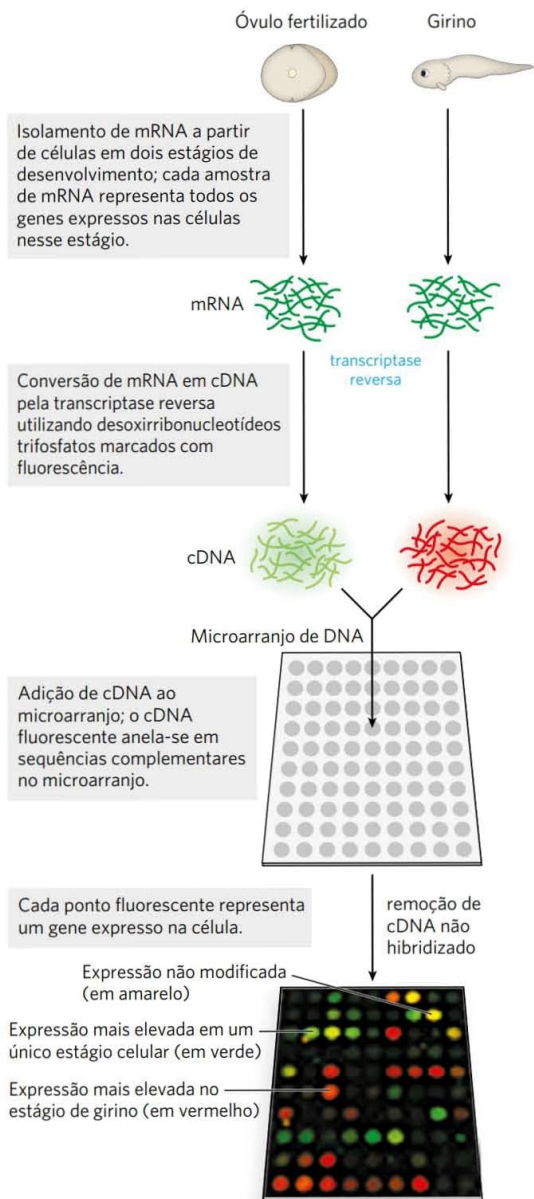


FIGURA 9-23 Experimento com microarranjo de DNA. Um microarranjo pode ser preparado a partir de qualquer sequência conhecida de DNA, de qualquer fonte. Quando o DNA se liga a um suporte sólido, outros ácidos nucleicos marcados com fluorescência podem servir como sondas para o microarranjo. Aqui, amostras de mRNA foram retiradas de células de sapo em dois estágios diferentes de desenvolvimento.

um estágio de desenvolvimento; aqueles que apresentam fluorescência vermelha representam genes expressos em níveis mais elevados em outra fase. Se um gene produz mRNA em igual abundância em ambas as fases de desenvolvimento, o ponto correspondente apresenta fluorescência amarela. Ao usar uma mistura de duas amostras para medir a abundância de sequência relativa e não absoluta, o método corrige as inconsistências entre pontos no microarranjo. Os pontos que apresentam fluorescência fornecem um panorama de todos os genes expressos nas

células no momento em que foram colhidos – expressão gênica examinada em uma escala do genoma total. Para um gene de função desconhecida, o tempo e as circunstâncias da sua expressão podem fornecer pistas importantes sobre o seu papel na célula.

Inativar ou alterar um gene com CRISPR pode revelar a função do gene

Um dos caminhos mais informativos para entender a função de um gene é mudar (mutar) o gene ou excluí-lo. Um pesquisador pode, então, examinar como a alteração genômica afeta o crescimento ou a função celular. Os métodos disponíveis para modificar genomas aumentam e são cada vez mais sofisticados. Uma estratégia cada vez mais comum é introduzir uma nuclease altamente específica em uma célula para cortar o gene de interesse em um sítio que é funcionalmente crítico, gerando a quebra da dupla-fita. Em eucariotos, essas quebras são mais comumente reparadas por sistemas celulares que promovem a união de extremidades não homólogas (NHEJ), um processo descrito no Capítulo 25. O NHEJ sela a quebra da dupla-fita, mas o processo é impreciso. Nucleotídeos geralmente são excluídos ou adicionados durante o reparo, inativando o gene. Nas bactérias, as quebras de cadeia dupla introduzidas são geralmente reparadas de forma mais precisa, por sistemas de recombinação homóloga (Capítulo 25), mas podem surgir mutações de inativação. Várias nucleases que podem ser direcionadas com precisão para quase todas as sequências foram projetadas, mas o processo era caro até o advento dos **sistemas CRISPR/Cas**, em 2011.

“CRISPR” significa repetições palindrômicas curtas agrupadas, intercaladas regularmente; como o nome sugere, elas consistem em uma série de repetições curtas regularmente espaçadas no genoma bacteriano. A proteína Cas (CRISPR-associada) é uma nuclease. As sequências CRISPR e a proteína Cas são componentes de um tipo de sistema imune que evoluiu para permitir que as bactérias sobrevivessem à infecção por bacteriófagos. As sequências CRISPR são incorporadas no genoma bacteriano, envolvendo sequências derivadas de agentes patogênicos de fago que previamente infectaram a bactéria sem matá-la. As sequências virais são, na verdade, sequências espaçadoras que separam as sequências CRISPR. Quando o mesmo bacteriófago ataca novamente uma bactéria com o sistema CRISPR/Cas correspondente, a sequência CRISPR e a proteína Cas agem em conjunto para destruir o DNA viral. Em primeiro lugar, as sequências CRISPR são transcritas para RNA, e as sequências espaçadoras virais individuais são clivadas para formar produtos chamados de **RNA-guia (gRNA)**, que incluem algum RNA repetido adjacente. Um gRNA forma um complexo com uma ou mais proteínas Cas e, em alguns casos, com outro RNA denominado **RNA CRISPR transativador**, ou **tracrRNA**. O complexo resultante liga-se especificamente ao DNA do bacteriófago invasor, cortando-o e destruindo-o por meio das atividades de nuclease associadas às proteínas Cas.

A tecnologia atual foi possível graças à descoberta de um sistema CRISPR/Cas relativamente simples em *Streptococcus pyogenes*. Esse sistema requer apenas uma única proteína Cas, Cas9, para clivar o DNA. O trabalho em muitos laboratórios, especialmente aqueles de Jennifer Doudna e Emmanuelle Charpentier, produziu um siste-

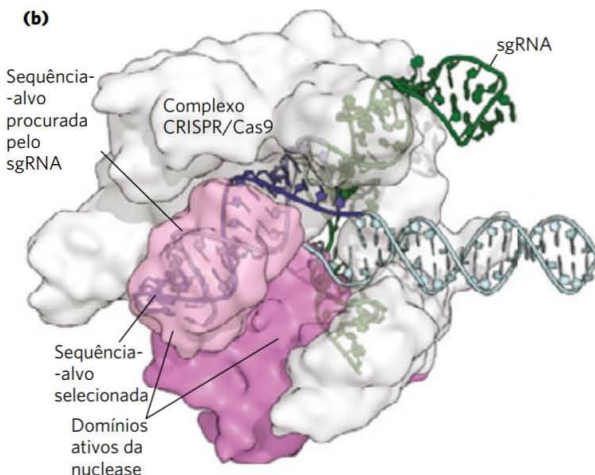
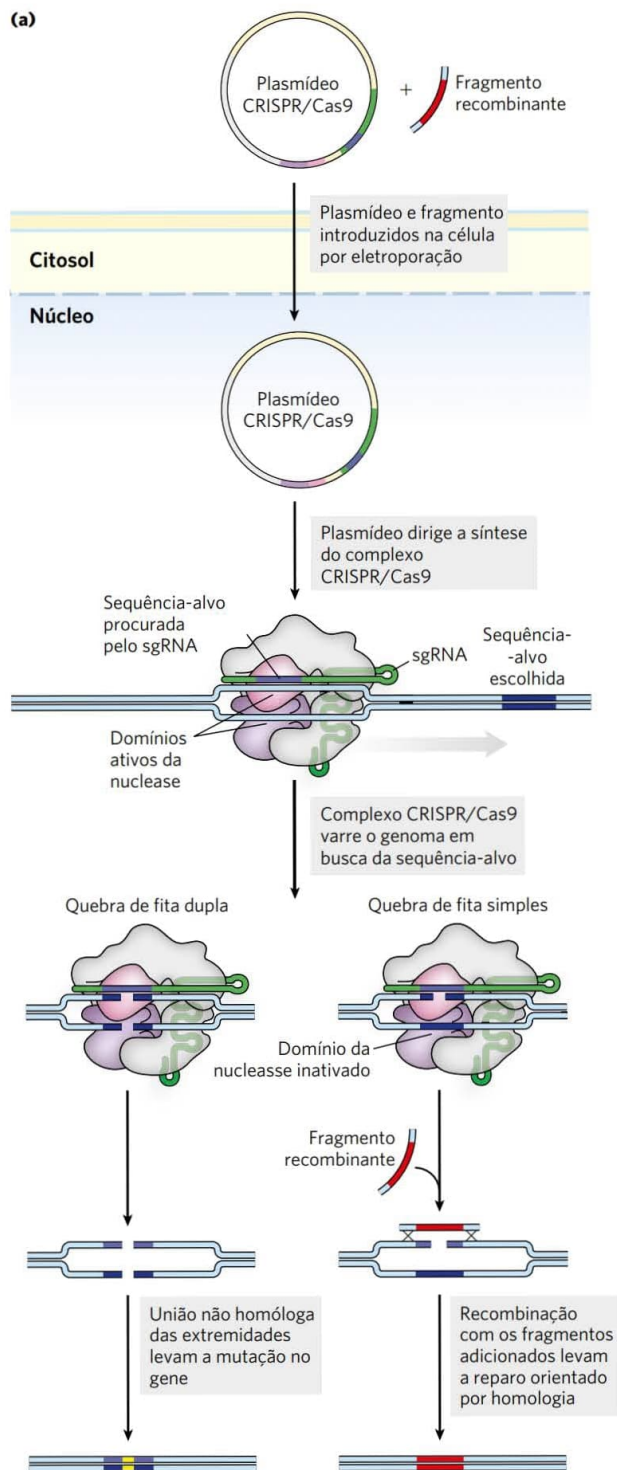


FIGURA 9-24 O sistema CRISPR/Cas9 para engenharia genômica.

(a) Os genes que codificam a proteína Cas9 e sgRNA são introduzidos em uma célula onde se planeja fazer uma mudança genômica. O sgRNA apresenta uma região complementar à sequência-alvo genômica escolhida (em roxo); esta região pode ser planejada para incluir qualquer sequência que se deseje. Um complexo composto pelo CRISPR sgRNA e a proteína Cas9 se forma dentro da célula e se liga ao local-alvo escolhido no DNA. A estrutura do complexo ligado está em **(b)**. Na via mostrada à esquerda em **(a)**, dois sítios ativos de nuclease na proteína Cas9 clivam separadamente cada cadeia de DNA no alvo, produzindo quebra na dupla-fita. A quebra da dupla-fita é geralmente reparada pela união de extremidades não homólogas, que geralmente exclui ou altera os nucleotídeos no local onde ocorre a união. De modo alternativo, como mostrado na via à direita, se um sítio de nuclease for inativado, a atividade da nuclease Cas9 cria uma quebra de fita simples na sequência-alvo. Na presença de um fragmento de DNA doador na recombinação, idêntico à sequência-alvo, mas incorporando a alteração de sequência desejada (fragmento mostrado em vermelho), a recombinação homóloga de DNA às vezes altera a sequência no local da ruptura para coincidir com a do DNA do doador. [Fonte: PDB ID 4UN3, C. Anders et al., *Nature* 513:569, 2014.]

DNA oposta. A inativação de um domínio cria uma enzima que corta apenas uma fita, formando uma quebra de fita simples ou fissura. O sgRNA é necessário para parear com a sequência-alvo no DNA e para ativar os domínios de nuclease para clivagem.

Os plasmídeos que expressam a proteína desejada e os componentes de RNA do complexo CRISPR/Cas9 podem ser introduzidos nas células por eletroporação (p. 325). Nas células de muitos organismos, o gene-alvo é inativado em 10 a 50% das células tratadas. Se for necessária uma mudança genômica (mutação), em vez de uma inativação genética simples, ela pode ser introduzida por recombinação, quando um fragmento de DNA que engloba o local de clivagem e que inclui a mudança desejada entra na célula com os plasmídeos CRISPR/Cas9. Esta recombinação é muitas vezes ineficiente, mas o sucesso pode ser melhorado um pouco ao introduzir uma fissura, em vez de uma quebra da dupla-fita, no local-alvo (Figura 9-24).

Novas aplicações para CRISPR/Cas9 estão sendo desenvolvidas rapidamente. Os potenciais usos terapêuticos ainda estão bem distantes, mas os avanços apontam para futuros tratamentos para doenças genéticas, doenças por HIV e muitas outras doenças humanas.

ma CRISPR/Cas9 simplificado, composto por apenas uma proteína (Cas9) e um RNA associado, composto por gRNA e tracrRNA fusionados ao **RNA-guia simples (sgRNA)**. A sequência-guia pode ser alterada para atingir quase todas as sequências genômicas (**Figura 9-24**). Cas9 tem dois domínios de nuclease separados: um domínio cliva a cadeia de DNA pareada com o sgRNA e o outro cliva a cadeia de

RESUMO 9.2 Utilização de métodos com base no DNA para a compreensão das funções das proteínas

- As proteínas são estudadas no nível da função fenotípica, celular ou molecular.
- As bibliotecas de DNA são um prelúdio para muitos tipos de pesquisas que produzem informação sobre a função de proteínas.
- Fusionando-se um gene de interesse com os genes que codificam a proteína fluorescente verde ou marcadores de epítomos, os pesquisadores podem visualizar a localização celular do produto gênico, tanto diretamente quanto por meio de imunofluorescência.
- As interações de uma proteína com outras proteínas ou com RNA podem ser investigadas por meio de marcadores de epítomos e imunoprecipitação ou cromatografia de afinidade. A análise de duplo-híbrido de levedura fornece sondas de interações moleculares *in vivo*.
- Os microarranjos podem revelar mudanças nos padrões de expressão dos genes em resposta a estímulos celulares, estágios de desenvolvimento ou mudança ambientais.
- O sistema CRISPR/Cas9 fornece uma maneira poderosa e barata de inativar genes ou alterar sua sequência para investigar sua função.

9.3 Genômica e história da humanidade

A automação do método original de sequenciamento de DNA de Sanger levou ao primeiro sequenciamento completo de genomas bacterianos na década de 1990. Duas sequências do genoma humano foram concluídas em 2001. Uma resultou de um esforço financiado publicamente, liderado primeiramente por James Watson e, mais tarde, por Francis Collins. Em paralelo, esforços privados foram liderados por Craig Venter. Essas conquistas se refletiram em mais de uma década de intensos esforços coordenados em dezenas de laboratórios ao redor do mundo e foram apenas o começo. Com o advento de novas tecnologias de sequenciamento (Capítulo 8), o tempo necessário para sequenciar um genoma humano foi reduzido de anos para dias.

O genoma humano é uma parte cada vez menor da história de sequenciamento dos genomas. Os genomas de milhares de outras espécies já foram sequenciados e disponibilizados publicamente, fornecendo uma visão sobre a

complexidade genômica ao longo dos três ramos da vida: Bacteria, Archaea e Eukarya (**Figura 9-25**). Considerando-se que muitos dos projetos de sequenciamento iniciais estavam focados em espécies comumente usadas em laboratórios de pesquisa, os projetos atuais incluem espécies de interesse prático, médico, agrícola e evolutivo. Os genomas de todas as famílias bacterianas conhecidas foram sequenciados. Já são milhares o número de sequências de genomas eucarióticos finalizados. Milhares de geno-

2016 e além: genomas pessoais

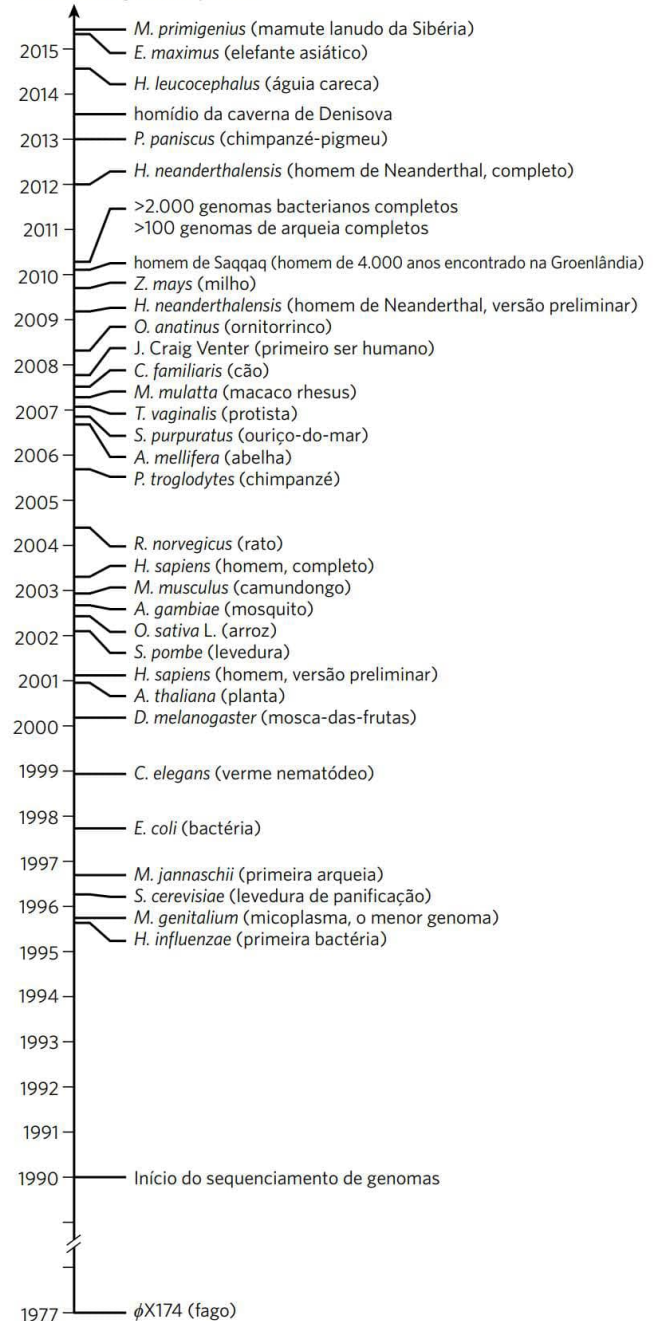


FIGURA 9-25 Uma linha do tempo do sequenciamento genômico.



Francis S. Collins
[Fonte: Alex Wong/
Getty Images.]



J. Craig Venter
[Fonte: Shawn Thew/Stringer/
AFP/Getty Images.]

mas humanos individuais foram sequenciados e, à medida que o número cresce, a medicina personalizada baseada no genoma está se tornando uma realidade (Quadro 9-1). Foram sequenciados os genomas de espécies extintas, como *Homo neanderthalensis*, e de seres humanos que morreram nos últimos milênios. Cada sequência genômica se torna um recurso internacional para pesquisadores. Coletivamente, os genomas fornecem uma fonte para am-

plas comparações que ajudam a identificar segmentos de genes variáveis e altamente conservados e permitem a identificação de genes que são exclusivos de uma espécie ou de um grupo de espécies. Os esforços para mapear genes, identificar novas proteínas e genes relacionados a doenças, elucidar padrões genéticos de interesse médico e rastrear nossa história evolutiva estão entre as muitas iniciativas em andamento.

QUADRO 9-1



MEDICINA

Medicina genômica personalizada

Os gêmeos californianos Noah e Alexis Beery nasceram com sintomas de paralisia cerebral. Os tratamentos não surtiram efeito. Insatisfeitos com o diagnóstico e o tratamento, os pais dos gêmeos, Joe e Retta Beery, os levaram, com a idade de 5 anos, a um especialista em Michigan, que os diagnosticou com uma rara condição genética, chamada de distonia responsiva à DOPA. Um regime de tratamento suprimiu com sucesso os sintomas e permitiu que os gêmeos levassem uma vida normal. Entretanto, aos 12 anos, Alexis desenvolveu tosse grave e dificuldades para respirar que novamente pareciam ameaçar a vida da menina. Em um episódio, paramédicos tiveram que reanimá-la duas vezes. Os sintomas não pareciam estar relacionados à distonia. Seria Noah o próximo? Frustrados e profundamente preocupados, os pais dos gêmeos procuraram o sequenciamento completo do genoma tanto de Noah quanto de Alexis. Essa decisão aparentemente incomum foi natural para a família Beery. Joe era o presidente da Life Technologies, desenvolvedores de tecnologias de sequenciamento em uso por muitos grandes centros de sequenciamento de DNA. Os casos de Noah e Alexis foram assumidos por Matthew Bainbridge e sua equipe no Baylor College of Medicine Human Genome Sequencing Center, em Houston, Texas. Os resultados mostraram-se decisivos. Os gêmeos apresentavam mutações em seus genomas que produziram não somente uma deficiência na DOPA, mas também uma potencial deficiência na produção do hormônio serotonina. Um pequeno ajuste na terapia de Alexis lhe proporcionou o fim dos sintomas que colocavam sua vida em risco e o mesmo tratamento foi oferecido ao seu irmão. Os dois irmãos agora levam uma vida normal.

O primeiro projeto de sequenciamento do genoma humano foi concluído em 2001, após 12 anos, a um custo de US\$ 3 bilhões. Esse custo caiu (Figura Q-1), e hoje genomas humanos completos são comuns. O objetivo de mil dólares pelo sequenciamento do genoma humano está no horizonte e promete tornar essa tecnologia amplamente disponível. Como a maioria das alterações genômicas que afetam a saúde humana está em genes codificadores de proteínas (suposição que pode ser contestada nos próximos anos), uma alternativa mais barata é simplesmente sequenciar o 1% do genoma que representa as regiões codificadoras (éxons) de genes, ou o **exoma**.

A primeira sequência do genoma humano veio de um genoma haploide, derivado de uma mistura de DNA de

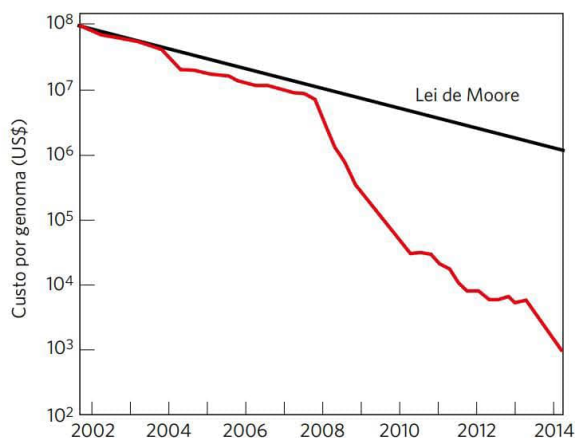


FIGURA Q-1 Desde janeiro de 2008, o custo do sequenciamento do genoma humano tem diminuído mais rápido do que o declínio projetado no custo do processamento de dados pelo computador (Lei de Moore). [Fonte: dados do National Human Genome Research Institute.]

vários indivíduos diferentes. Um genoma de referência de alta qualidade foi concluído em 2004. Sequências do genoma humano concluídas posteriormente, muitas de genomas diploides individuais, demonstraram o quanto existe de variação genética individual. Em relação à sequência de referência, um ser humano típico tem cerca de 3,5 milhões de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs, ver p. 347) e outras poucas centenas de milhares de diferenças na forma de pequenas inserções e deleções e alterações nos números de cópias de repetições. Cerca de 60% dos SNPs são heterozigotos, presentes em apenas um dos dois cromossomos. Apenas uma pequena porção (5.000 a 10.000) dos SNPs afeta as sequências de aminoácidos das proteínas codificadas pelos genes.

Essa complexidade assegura que, pelo menos a curto prazo, o diagnóstico bem-sucedido de uma condição pelo sequenciamento de todo o genoma será uma exceção, e não a regra. Entretanto, a genômica humana está avançando rapidamente. O número de casos de sucesso aumenta à medida que a tecnologia se torna mais amplamente disponível e se aprimora a capacidade das análises genômicas para reconhecer alterações genéticas causadoras de doenças.

Anotação fornece uma descrição do genoma

Uma sequência do genoma é simplesmente uma sequência muito longa de resíduos de A, G, T e C, tudo sem sentido até ser interpretado. O processo de **anotação do genoma** produz informações sobre a localização e a função de genes e outras sequências cruciais. A anotação do genoma converte a sequência em informações que qualquer pesquisador pode usar, e geralmente tem como foco o DNA genômico que engloba genes que codificam RNA e proteína, os alvos mais comuns da pesquisa científica. Todo genoma recém-sequenciado inclui muitos genes – muitas vezes 40% ou mais do total – sobre o qual pouco ou nada é conhecido.

Usando ferramentas baseadas na *Web* que aplicam o poder computacional à genômica comparativa, os cientistas podem definir a localização de genes e atribuir funções de genes (sempre que possível) com base na similaridade com genes previamente estudados em outros genomas. O algoritmo clássico BLAST (do inglês, *basic local alignment search tool*) permite uma pesquisa rápida de todos os bancos de dados do genoma para sequências relacionadas a alguma que um pesquisador está explorando e é especialmente valioso para investigar a função de um gene específico. BLAST é uma das muitas fontes disponibilizadas pelo *site* do NCBI (National Center for Biotechnology Information) (www.ncbi.nlm.nih.gov), patrocinado pelo National Institutes of Health, e pelo *site* do Ensembl (www.ensembl.org), copatrocinado pelo EMBL-EBI (European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute) e o Wellcome Trust Sanger Institute.

Em cada sequência genômica recém-descrita, os muitos segmentos e genes genômicos que ainda não foram caracterizados – que perfazem 40% ou mais do total – constituem um desafio especial. Elucidar a função desses elementos genômicos provavelmente levará muitas décadas. Muitas das abordagens experimentais atuais enfocam novamente os genes que codificam proteínas. Uma mudança no padrão de crescimento ou em outras propriedades de um organismo quando um gene é inativado fornece informações sobre a função fenotípica do produto proteico do gene. Para vários genomas, incluindo os de *S. cerevisiae* e da planta *Arabidopsis thaliana*, coleções de genes nocaute (inativação) foram desenvolvidas por engenharia genética. Cada clone na coleção de um organismo tem um gene inativado diferente, e uma grande fração dos genes dessa espécie (exceto um núcleo de genes essenciais para a vida em todos os momentos) está representada no conjunto nocaute. Para organismos unicelulares, como as leveduras, essas coleções são abrangentes. Para animais multicelulares complexos, como os camundongos, as coleções nocaute são construídas cuidadosamente ao longo do tempo por muitos grupos de pesquisa diferentes, uma mutação por vez.

O genoma humano contém vários tipos de sequências

Todas estas bases de dados em rápido crescimento têm o potencial não só de impulsionar os avanços em todos os âmbitos da bioquímica, mas de mudar a forma como pensamos em nós mesmos. O que nos revela o genoma humano e sua comparação com o de outros organismos?

Em alguns aspectos, o ser humano não é tão complicado como se imaginava. A estimativa de décadas atrás de que os

seres humanos tivessem cerca de 100 mil genes nos aproximadamente $3,2 \times 10^9$ pares de bases do genoma humano foi substituída pela descoberta de que existem apenas cerca de 20 mil genes codificadores de proteínas – menos do que o dobro do número da mosca-das-frutas (13,600 genes), não muito mais do que em um nematódeo (19.700 genes) e menos do que em uma planta de arroz (38.000 genes).

Considerando de outro modo, somos mais complexos do que previsto anteriormente. Muitos, senão a maioria dos genes eucarióticos, contêm um ou mais segmentos de DNA que não codificam para a sequência de aminoácidos de um produto polipeptídico. Essas inserções não traduzidas interrompem, por outro lado, a relação colinear entre a sequência de nucleotídeos do gene e a sequência de aminoácidos do polipeptídeo codificado. Esses segmentos não traduzidos são denominados sequências interventoras, ou **íntrons**, e os segmentos codificantes são chamados de **éxons** (**Figura 9-26**); poucos genes bacterianos contêm íntrons. Os íntrons são removidos do transcrito primário de RNA para produzir um transcrito que pode ser traduzido ininterruptamente em um produto proteico (ver Capítulo 26). Um éxon muitas vezes (mas nem sempre) codifica um único domínio de uma proteína maior com vários domínios. Os seres humanos compartilham muitos tipos de domínio de proteínas com plantas, vermes e moscas, mas os domínios são misturados e combinados de maneira mais complexa, aumentando a variedade de proteínas encontradas em nosso proteoma. Modos alternativos de expressão gênica e *splicing* de RNA permitem combinações alternativas de éxons, levando à produção de mais de uma proteína a partir de um único gene. O *splicing* alternativo (Capítulo 26) é muito mais comum em seres humanos e outros vertebrados do que em vermes ou bactérias, permitindo maior complexidade no número e nos tipos de proteínas geradas.

Nos mamíferos e em alguns outros eucariotos, um gene normal tem uma proporção muito maior de íntrons do que éxons no DNA; na maioria dos casos, a função dos íntrons não é clara. Apenas cerca de 1,5% do DNA humano é “codificador” ou éxon, transportando a informação para produtos proteicos (**Figura 9-27a**). Entretanto, quando íntrons são incluídos na contagem, cerca de 30% do genoma humano é constituído por genes que codificam proteínas. Vários esfor-

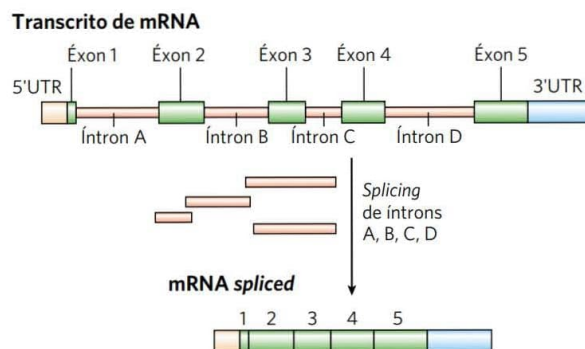


FIGURA 9-26 Íntrons e éxons. Esse transcrito gênico contém cinco éxons e quatro íntrons ao longo das regiões 5' e 3' não traduzidas (5' UTR e 3' UTR). O *splicing* remove os íntrons para criar um produto de mRNA para a tradução na proteína.

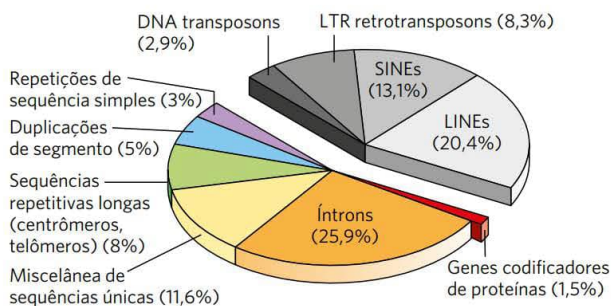
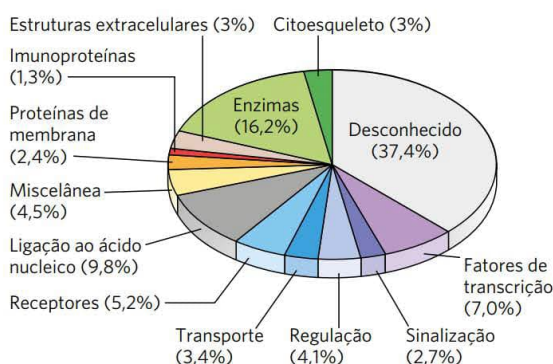
(a) Genoma humano: tipos de seqüências de DNA**(b) Genoma humano: genes codificadores de proteínas**

FIGURA 9-27 Panorama do genoma humano. (a) Este gráfico setorial mostra as proporções de vários tipos de seqüências no genoma humano. As classes de transposons que perfazem quase metade do DNA genômico total estão indicadas em tons de cinza. Os retrotransposons de LTR são retrotransposons com repetições terminais longas (ver Figura 26-36). Elementos nucleares intercalados longos (LINEs) e elementos nucleares intercalados curtos (SINEs) são classes especiais de transposons de DNA particularmente comuns. (b) Os aproximadamente 20 mil genes codificadores de proteínas no genoma humano podem ser classificados pelo tipo de proteína que codificam. [Fontes: (a) dados de T. R. Gregory, *Nature Rev. Genet.* 6:699, 2005. (b) Dados de www.pantherdb.org.]

ços estão em andamento para classificar genes codificantes de proteínas pelo tipo de função (Figura 9-27b).

A relativa escassez de genes codificadores de proteínas no genoma humano deixa uma grande quantidade de DNA sem função. Grande parte do DNA que não codifica proteínas está na forma de seqüências repetidas de vários tipos. Talvez o mais surpreendente é que cerca de metade do genoma humano é composto de seqüências moderadamente repetidas que derivam de **transposons**, segmentos de DNA, variando de algumas centenas a vários milhares de pares de bases, que podem se mover de um local para outro no genoma. Originalmente descoberto no milho por Barbara McClintock, que os chamou de elementos transponíveis, os transposons são uma espécie de parasita molecular. Eles se estabelecem nos genomas de praticamente todos os organismos. Muitos transposons contêm genes que codificam proteínas que catalisam o próprio processo de transposição, como detalhado nos Capítulos 25 e 26. Existem várias classes de transposons no genoma humano. Muitos são essen-

cialmente segmentos de DNA, que aumentaram em número lentamente ao longo de milênios como resultado de eventos de replicação acoplados ao processo de transposição. Alguns, chamados de retrotransposons, estão intimamente relacionados com retrovírus, transpondo de uma localização genômica para outra através de intermediários de RNA que são reconvertidos em DNA por transcrição reversa. Alguns transposons no genoma humano são elementos ativos, movendo-se em baixa frequência, mas a maioria é inativa, relíquias evolutivas alteradas por mutações. O movimento do transposon pode levar à redistribuição de outras seqüências genômicas, e isso tem desempenhado um papel importante na evolução humana.

Uma vez que os genes codificadores de proteínas (incluindo os éxons e íntrons) e os transposons sejam levados em conta, talvez reste cerca de 25% do DNA total. Como uma continuação do Projeto Genoma Humano, a iniciativa ENCODE foi lançada pelo U.S. National Human Genome Research Institute, em 2003, para identificar elementos funcionais no genoma humano. O trabalho do consórcio mundial de grupos de pesquisa envolvidos na iniciativa ENCODE revelou que a grande maioria (> 80%, incluindo a maioria dos transposons) do DNA no genoma humano é transcrita em RNA em pelo menos um tipo de célula ou tecido ou está envolvida em algum aspecto funcional da estrutura da cromatina. Grande parte do DNA não codificante (não transcrito) nos 20% restantes contém elementos reguladores que afetam a expressão dos 20 mil genes codificadores de proteínas e os muitos genes adicionais que codificam os RNAs funcionais. Muitas mutações (SNPs; descritas abaixo) associadas a doenças genéticas humanas estão neste DNA não codificante, provavelmente afetando a regulação de um ou mais genes. Conforme descrito nos capítulos 26 e 27, novas classes de RNAs funcionais estão sendo descobertas em um ritmo rápido. Muitos desses RNAs funcionais, sendo atualmente identificados por uma variedade de métodos de triagem, são produzidos por genes codificadores de RNA, cuja existência era desconhecida previamente.

Em torno de 3% ou menos do genoma humano são compostos de seqüências altamente repetitivas, chamadas de **repetições de seqüências simples (SSR)**. Geralmente com menos de 10 pb, uma SSR é às vezes repetida milhões de vezes por célula, distribuída em segmentos curtos de repetições em série. Os exemplos mais proeminentes de DNA SSR são encontrados em centrômeros e telômeros (ver Capítulo 24). Os telômeros humanos, por exemplo, consistem em até 2 mil repetições contíguas da seqüência GGTTAG. Repetições adicionais, mais curtas, de seqüências simples também ocorrem em todo o genoma. Estes segmentos isolados de seqüências repetidas, muitas vezes contendo até algumas dúzias de repetições em série de uma seqüência simples, são chamadas de **repetições curtas em tandem (STR)**. Essas seqüências são os alvos das tecnologias usadas na análise de DNA forense (ver Quadro 8-1).

O que todas essas informações nos revelam sobre as semelhanças e diferenças entre os seres humanos individuais? Dentro da população humana há milhões de variações de base única, chamadas de **polimorfismos de nucleotídeo único**, ou **SNPs** (pronuncia-se "snips"). Cada ser humano

difere do próximo, em média, em 1 em cada 1.000 pb. Muitas dessas variações estão na forma de SNPs, mas a população humana também tem uma ampla gama de deleções grandes, inserções e pequenos rearranjos. A partir dessas diferenças genéticas, muitas vezes sutis, temos a variedade humana que todos conhecemos – como diferenças na cor do cabelo, estatura, tamanho do pé, acuidade visual, alergia à medicação e comportamento (em um grau desconhecido).

O processo de recombinação genética durante a meiose tende a misturar e combinar essas pequenas variações genéticas, de modo que diferentes combinações de genes são herdadas (ver Capítulo 25). No entanto, grupos de SNPs e outras diferenças genéticas que estão próximos em um cromossomo raramente são afetados por recombinação e são geralmente herdados juntos; esse agrupamento de múltiplos SNPs é conhecido como **haplótipo**. Os haplótipos fornecem marcadores convenientes para algumas populações humanas e indivíduos dentro das populações.

Para definir um haplótipo são necessárias várias etapas. Em primeiro lugar, as posições que contêm SNP na população humana são identificadas em amostras de DNA genômico a partir de muitos indivíduos (**Figura 9-28a**). Cada SNP em um haplótipo prospectivo pode ser separado do próximo SNP por vários milhares de pares de bases e ainda ser considerado “próximo” no contexto de cromossomos que se estendem por milhões de pares de bases. Em segundo lugar, um conjunto de SNPs geralmente herdados juntos é definido como um haplótipo (**Figura 9-28b**); cada haplótipo consiste nas bases específicas encontradas nas várias posições do SNP dentro do conjunto definido. Finalmente, os *tag* SNPs – um subconjunto de SNPs que definem um haplótipo inteiro – são escolhidos para identificar exclusivamente cada haplótipo (**Figura 9-28c**). Por meio do sequenciamento

de apenas essas posições-chave em amostras genômicas de populações humanas, os pesquisadores identificam rapidamente quais haplótipos estão presentes em cada indivíduo. Haplótipos especialmente estáveis são encontrados no genoma mitocondrial (que não sofre recombinação meiótica) e no cromossomo Y (apenas 3% dos quais são homólogos ao cromossomo X e, portanto, sujeitos à recombinação). Como veremos mais adiante, os haplótipos podem ser usados como marcadores para rastrear migrações humanas.

O sequenciamento do genoma dá informações sobre a humanidade

Os projetos de sequenciamento genômico permitem que os pesquisadores identifiquem elementos genéticos conservados que apresentam significância funcional, incluindo sequências de éxons conservadas, regiões reguladoras e outras características genômicas (como centrômeros e telômeros). No estudo em curso do genoma humano, os pesquisadores estão mais interessados nas diferenças entre o genoma humano e os de outros organismos. Confiando novamente no poder da teoria da evolução, essas diferenças podem revelar a base molecular das doenças genéticas humanas. Elas também podem ajudar a identificar genes, alterações gênicas e outras características genômicas que são exclusivas do genoma humano e, portanto, provavelmente contribuem para as características definidamente humanas.

O genoma humano está intimamente relacionado com outros genomas de mamíferos em grandes segmentos de cada cromossomo. No entanto, para um genoma medido em bilhões de pares de bases, diferenças de apenas alguns por cento podem adicionar até milhões de diferenças genéticas. Pesquisando entre estes e fazendo uso de técnicas de genômica comparativa, os pesquisadores podem começar a

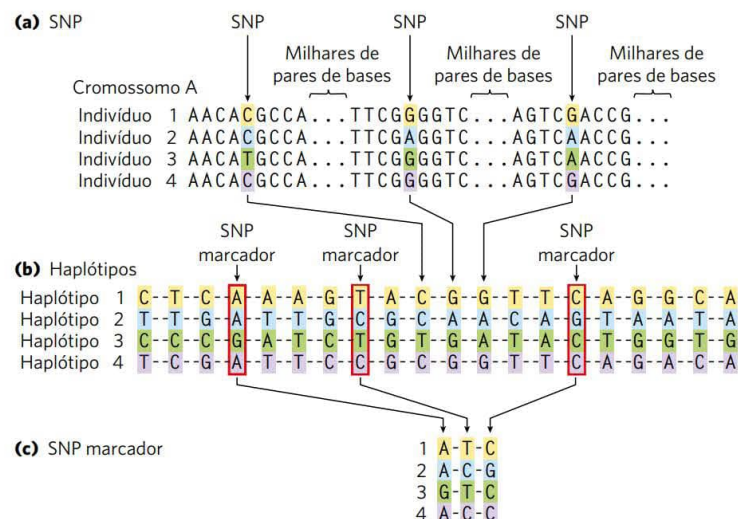


FIGURA 9-28 Identificação de haplótipos. (a) As posições dos SNPs no genoma humano podem ser identificadas em amostras genômicas. Os SNPs podem estar em qualquer parte do genoma, seja ou não parte de um gene conhecido. (b) Grupos de SNPs são compilados em um haplótipo. Os SNPs variam na população humana em geral, como nos quatro indivíduos fictícios mostrados aqui, mas os SNPs escolhidos para definir um haplótipo são frequentemente os mesmos na maioria dos indivíduos de uma população específica. (c) Alguns SNPs são escolhidos como definidores de haplótipos (*tag* SNPs, destacados em vermelho) e são usados para simplificar o processo de identificação do haplótipo de um indivíduo (sequenciando 3 em vez de 20 *loci*). Por exemplo, se as posições mostradas aqui forem sequenciadas, o haplótipo A-T-C pode ser característico de uma população nativa em um local no norte da Europa, ao passo que G-T-C pode ser a sequência predominante em uma população na Ásia. Vários haplótipos desse tipo são usados para rastrear migrações humanas pré-históricas. [Fonte: informação do International HapMap Consortium, *Nature* 426:789, 2003, Fig. 1.]

explorar a base molecular do nosso grande cérebro, habilidades de linguagem, capacidade de fazer ferramentas ou bipedalismo.

As sequências do genoma de nossos parentes biológicos mais próximos, o chimpanzé (*Pan troglodytes*) e o chimpanzé-pigmeu (*Pan paniscus*), oferecem algumas pistas importantes, as quais podemos usar para ilustrar o processo comparativo. Os seres humanos e os chimpanzés compartilharam um ancestral comum cerca de 7 milhões de anos atrás. Diferenças genômicas entre as espécies, incluindo SNPs e rearranjos genômicos maiores, como inversões, deleções e fusões, podem ser usadas para construir uma árvore filogenética (Figura 9-29a). Ao longo do curso da evolução, segmentos de cromossomos podem se tornar invertidos como resultado de uma duplicação segmentar, transposição de uma cópia para outro braço do mesmo cromossomo e recombinação entre eles (Figura 9-29b); essas inversões ocorreram na linhagem humana nos cromossomos 1, 12, 15, 16 e 18. Dois cromossomos encontrados em outras linhagens de primatas foram fundidos para formar o cromossomo humano 2 (Figura 9-29c). A linhagem humana, portanto, tem 23 pares de cromossomos, em vez dos 24 pares típicos dos símios. Quando essa fusão apareceu na linha que conduz aos seres humanos, ela representou uma grande barreira para o cruzamento com outros primatas que não a apresentavam.

Se olharmos apenas para mudanças de pares de bases, os genomas de seres humanos e os de chimpanzés publicados diferem em apenas 1,23% (comparado com a variação de 0,1% de um ser humano para outro). Algumas variações estão em posições onde há um polimorfismo conhecido na população humana ou de chimpanzés, e é pouco provável que elas reflitam uma mudança evolutiva que defina as espécies. Quando ignoramos essas posições, as diferenças chegam a cerca de 1,06% ou cerca de 1 em 100 pb. Essa pequena fração se traduz em mais de 30 milhões de diferenças de pares de bases, alguns dos quais afetam a função proteica e a regulação gênica. Os seres humanos estão aproximadamente tão relacionados aos chimpanzé-pigmeu quanto aos chimpanzés.

Os rearranjos genômicos que ajudam a distinguir os chimpanzés e os seres humanos incluem 5 milhões de inserções curtas ou deleções envolvendo alguns pares de bases cada, bem como um número substancial de inserções maiores, deleções, inversões ou duplicações que podem envolver muitos milhares de pares de bases. Quando inserções de transposons – uma fonte importante de variação genômica – são adicionadas à lista, as diferenças entre os genomas de seres humanos e os de chimpanzés aumentam. O genoma do chimpanzé apresenta duas classes de retrotransposons que não estão presentes no genoma humano (ver Capítulo 26). Outros tipos de rearranjos, sobretudo duplicações segmentares, também são comuns em linhagens de primatas. Duplicações de segmentos cromossômicos podem levar a mudanças na expressão de genes contidos nesses segmentos. Existem cerca de 90 milhões de pb dessas diferenças entre seres humanos e chimpanzés, representando outros 3% desses genomas. Cada espécie tem segmentos de DNA, constituindo de 40 a 45 milhões de pb, que são inteiramente exclusivos desse genoma específico, com inserções cromossômicas maiores, duplicações e outros rearranjos que afetam mais pares de bases do que alterações de um único

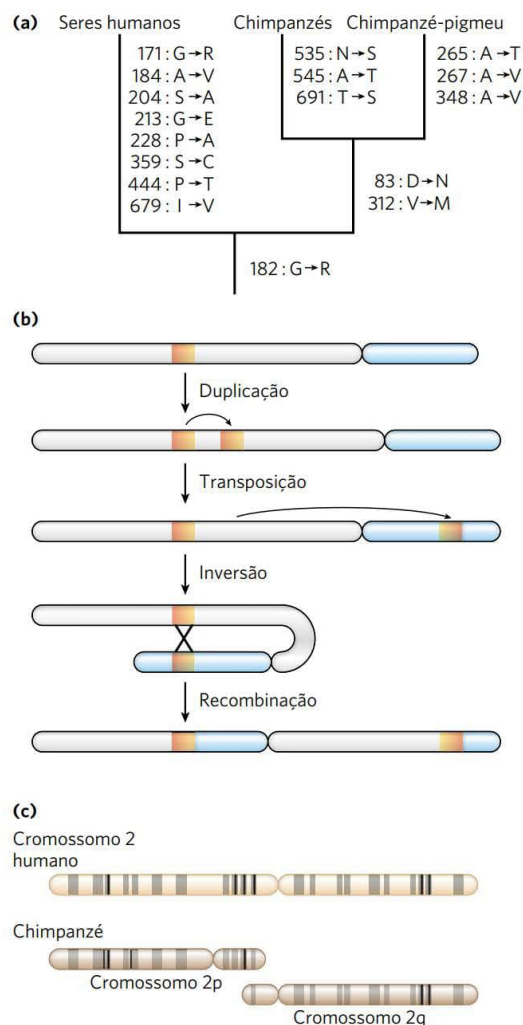


FIGURA 9-29 Alterações genômicas na linhagem humana.

(a) Esta árvore evolutiva é do receptor de progesterona, que ajuda a regular muitos eventos na reprodução. O gene que codifica essa proteína sofreu mais alterações evolutivas do que a maioria. Mudanças de aminoácidos associadas unicamente com o ser humano, o chimpanzé e o Chimpanzé-pigmeu estão listadas ao lado de cada ramo (com o número de resíduos). **(b)** Um dos processos de várias etapas que pode levar à inversão de um segmento cromossômico. Um gene ou um segmento cromossômico é duplicado, depois movido para outro local cromossômico por transposição. A recombinação dos dois segmentos pode resultar na inversão do DNA entre eles. **(c)** Os genes nos cromossomos 2p e 2q dos chimpanzés são homólogos àqueles no cromossomo humano 2, indicando que dois cromossomos se fundiram em algum ponto do ramo que leva aos seres humanos. Regiões homólogas podem ser visualizadas como bandas criadas em metáfase por certos corantes, como mostrado aqui. [Fonte: (a) informação de C. Chen, *Mol. Phylogenet. Evol.* 47:637, 2008.]

nucleotídeo. Assim, no total, os chimpanzés e os seres humanos diferem em cerca de 4% dos seus genomas.

Classificar as diferenças genômicas relevantes para características exclusivamente humanas é uma tarefa descorajadora. Se supormos uma taxa semelhante de evolução nas linhagens de chimpanzés e de seres humanos depois que eles divergiram do ancestral que têm em comum, metade das mudanças representa mudanças de linhagem de

chimpanzés e metade representa mudanças de linhagem humana. Ao comparar as duas sequências do genoma com aquelas de espécies mais distantes, denominadas **grupos externos**, podemos determinar qual variante estava presente no ancestral comum. Considere um *locus* X, onde existe uma diferença entre o genoma humano e o do chimpanzé (**Figura 9-30**). A linhagem do orangotango, um grupo externo, divergiu da do chimpanzé e do ser humano antes do ancestral comum do chimpanzé e do ser humano. Se a sequência no *locus* X é idêntica em orangotangos e chimpanzés, essa sequência estava provavelmente presente no ancestral chimpanzé-ser humano, e a sequência observada em seres humanos é específica para a linhagem humana. As sequências que são idênticas em seres humanos e nos orangotangos podem ser eliminadas como candidatas para características genômicas humanas específicas. A importância de comparações com grupos externos intimamente relacionados originou novos esforços para sequenciar o genoma de orangotangos, macacos e muitas outras espécies de primatas. A comparação dos genomas humano e do chimpanzé-pigmeu está refinando a análise de genes e alelos de significado especial para os seres humanos.

A busca pelas bases genéticas de características humanas especiais, como a função cerebral avançada, beneficia-se de duas abordagens complementares. A primeira procura por regiões genômicas onde mudanças extremas ocorreram, como genes que foram duplicados muitas vezes ou segmentos genômicos grandes ausentes em outros primatas. A segunda abordagem analisa genes conhecidos envolvidos em condições humanas relevantes. Para a função cerebral, por exemplo, pode-se examinar genes que, quan-

do mutados, contribuem para os transtornos cognitivos ou outros distúrbios mentais.

As alterações genéticas observadas são às vezes concentradas em um gene ou uma região específica, sugerindo que esses genes ou regiões tenham desempenhado um papel na evolução de características humanas especiais. Em princípio, traços específicos de seres humanos poderiam refletir mudanças em genes codificadores de proteínas, em processos regulatórios ou em ambos. Algumas classes de genes codificadores de proteínas mostram evidências de divergência acelerada (mais substituições de aminoácidos do que na maioria dos outros genes). Estes incluem genes envolvidos na percepção quimiossensorial, função imune e reprodução. Nestes casos, a evolução rápida é evidente em praticamente todos os ramos de primatas, refletindo funções fisiológicas que são fundamentais para todas as espécies de primatas. Outra classe de genes que mostra evidências de evolução acelerada é aquela que codifica fatores de transcrição – proteínas envolvidas na expressão de outros genes (ver Capítulo 26).

De modo notável, as análises da linhagem humana não detectaram uma taxa aumentada de mudança genética em genes codificadores de proteínas envolvidos no desenvolvimento ou no tamanho do cérebro. Em primatas, a maioria dos genes que funcionam exclusivamente no cérebro são ainda mais altamente conservados do que genes que funcionam em outros tecidos, talvez devido a algumas restrições especiais relacionadas à bioquímica do cérebro. No entanto, algumas diferenças na expressão gênica entre seres humanos e outros primatas são observadas. Por exemplo, o gene que codifica a enzima glutamato-desidrogenase, que desempenha um papel importante na síntese de neurotransmissores, tem um número de cópias aumentado em seres humanos devido à duplicação gênica. As regiões genômicas relacionadas à regulação gênica apresentam um número desproporcionalmente elevado de alterações nos genes envolvidos no desenvolvimento neural e na nutrição. Diversos genes codificadores de RNA, alguns com expressão concentrada no cérebro, também mostram evidências de evolução acelerada (**Figura 9-31**). Muitos destes estão provavelmente envolvidos na regulação da expressão de outros genes. À medida que continuamos a descobrir muitas novas classes de RNA (ver Capítulo 26), é provável que ocorram mudanças radicais na nossa perspectiva sobre como a evolução altera o funcionamento dos sistemas vivos.

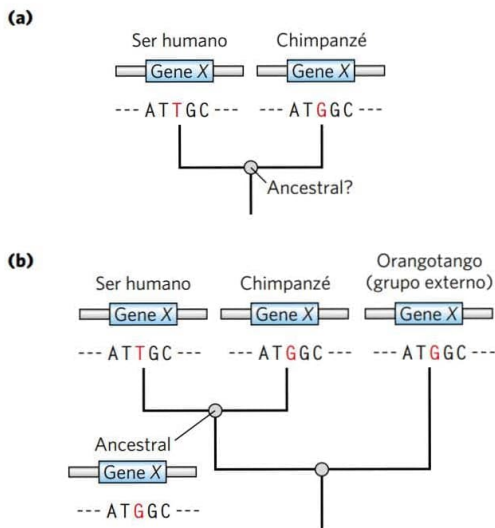


FIGURA 9-30 Determinação das alterações de sequências únicas para uma linhagem ancestral. (a) São comparadas as sequências do mesmo gene hipotético em seres humanos e chimpanzés. A sequência nesse gene no ancestral comum das duas espécies não é conhecida. (b) O genoma do orangotango é utilizado como um grupo externo. A sequência do gene do orangotango é idêntica à do gene do chimpanzé. Isso significa que a mutação que leva a diferenças entre seres humanos e chimpanzés quase certamente ocorreu na linhagem que conduziu aos seres humanos modernos, e o ancestral comum de seres humanos e chimpanzés (e orangotangos) tinha a sequência agora encontrada em chimpanzés.

Comparações do genoma ajudam a localizar genes envolvidos em doenças



Uma das motivações para o Projeto Genoma Humano foi o seu potencial para acelerar a descoberta de genes subjacentes a doenças genéticas. Essa promessa foi cumprida: mais de 4.500 fenótipos de mutações em seres humanos, principalmente associados a doenças genéticas, foram mapeados em genes específicos. Alguns caçadores de genes de doenças alertam que, até agora, o trabalho pode ter revelado, em sua maioria, casos relativamente fáceis e que muitos desafios permanecem.

A abordagem principal durante as duas últimas décadas usa **análise de ligação**, mais uma abordagem derivada da biologia evolutiva. Em resumo, o gene envolvido em uma condição de doença é mapeado em relação a polimorfismos

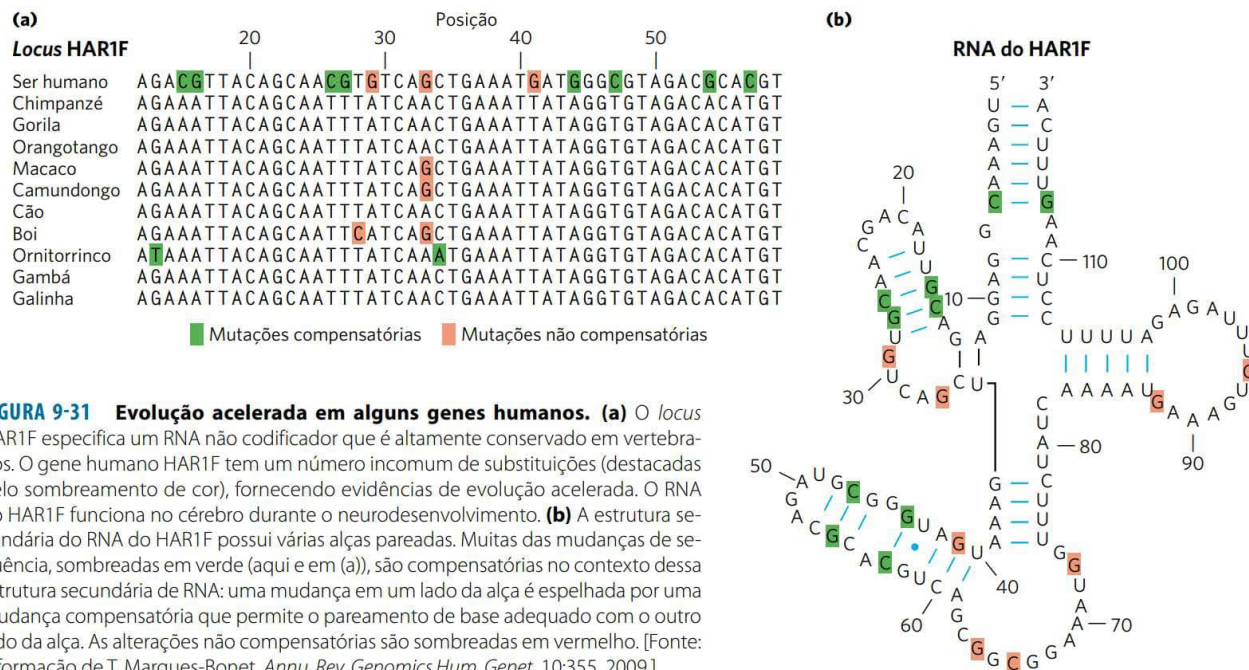


FIGURA 9-31 Evolução acelerada em alguns genes humanos. (a) O locus HAR1F especifica um RNA não codificador que é altamente conservado em vertebrados. O gene humano HAR1F tem um número incomum de substituições (destacadas pelo sombreado de cor), fornecendo evidências de evolução acelerada. O RNA do HAR1F funciona no cérebro durante o neurodesenvolvimento. (b) A estrutura secundária do RNA do HAR1F possui várias alças pareadas. Muitas das mudanças de sequência, sombreadas em verde (aqui e em (a)), são compensatórias no contexto dessa estrutura secundária de RNA: uma mudança em um lado da alça é espelhada por uma mudança compensatória que permite o pareamento de base adequado com o outro lado da alça. As alterações não compensatórias são sombreadas em vermelho. [Fonte: informação de T. Marques-Bonet, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 10:355, 2009.]

genéticos bem caracterizados que ocorrem em todo o genoma humano. Podemos ilustrar isso descrevendo a busca por um gene envolvido na doença de Alzheimer de início precoce. Cerca de 10% de todos os casos de doença de Alzheimer nos Estados Unidos resultam de uma predisposição hereditária. Vários genes diferentes que foram descobertos, quando mutados, podem levar ao aparecimento precoce da doença de Alzheimer. Um desses genes (*PS1*) codifica a proteína presenilina 1, e a análise de ligação foi muito utilizada para sua descoberta. A busca começa com famílias numerosas com muitos indivíduos afetados por uma doença específica – neste caso, a doença de Alzheimer. Duas das muitas linhagens familiares usadas para procurar esse gene no início dos anos 90 estão mostrados na **Figura 9-32a**. Em estudos desse tipo, amostras de DNA são coletadas de membros afetados e não afetados da família. Os pesquisadores primeiro localizam a região associada a uma doença por um cromossomo específico, comparando os genótipos de indivíduos com e sem a doença, concentrando-se especialmente nos membros próximos da família. Os pontos específicos de comparação são conjuntos de *loci* de SNPs bem caracterizados, mapeados para cada cromossomo, conforme identificado pelo Projeto Genoma Humano. Ao identificar os SNPs que são mais frequentemente herdados com o gene causador da doença, os investigadores podem gradativamente localizar o gene responsável em um único cromossomo. No caso do gene *PS1*, a co-hereditariedade foi mais forte com marcadores no cromossomo 14 (**Figura 9-32b**).

Os cromossomos são moléculas de DNA muito grandes, e a localização do gene em um cromossomo é apenas uma pequena parte da batalha. Estabelece-se que este cromossomo contém uma mutação que dá origem à doença, mas em cada genoma humano individual, cada cromossomo abriga milhares de SNPs e outras alterações. É improvável que o sequenciamento simples do cromossomo inteiro revele o SNP ou outra alteração associada à doença. Em vez disso, os

pesquisadores confiam em métodos estatísticos que correlacionam a herança de polimorfismos adicionais, mais próximos à ocorrência da doença, com foco em um painel mais denso de polimorfismos conhecidos no cromossomo de interesse. Quanto mais próximo um marcador está localizado do gene de uma doença, maior a probabilidade de ele ter sido herdado junto com esse gene. Esse processo pode identificar uma região do cromossomo que contém o gene. No entanto, a região ainda pode abranger muitos genes. Nesse exemplo, a análise de ligação indicou que o gene causador da doença, *PS1*, estava em algum lugar próximo do SNP do locus D14S43 (**Figura 9-32c**).

Os passos finais na identificação do gene usam os bancos de dados do genoma humano. A região local contendo o gene é examinada, e os genes dentro dela são identificados. O DNA de muitos indivíduos, alguns com a doença e outros sem, é sequenciado nessa região. Como o DNA nessa região é sequenciado a partir de um número crescente de indivíduos, variantes genéticas que estão consistentemente presentes em indivíduos com a doença e ausentes em indivíduos não afetados podem ser identificadas. A pesquisa pode ser auxiliada por uma compreensão da função dos genes na região-alvo, uma vez que vias metabólicas específicas podem ser mais propensas a produzir a doença do que outras. Em 1995, o gene no cromossomo 14 associado à doença de Alzheimer foi identificado como o gene *S182*. O produto desse gene foi denominado presenilina 1, e o gene depois foi renomeado para *PS1*.

Muitas doenças genéticas humanas são causadas por mutações em um único gene ou em sequências envolvidas em sua regulação. Várias mutações diferentes em um gene específico, todas levando à mesma condição genética ou relacionadas, podem estar presentes na população humana. Por exemplo, existem várias variantes do *PS1*, todas dando origem a um risco muito maior de doença de Alzheimer de início precoce. Outro exemplo mais extremo são os vários

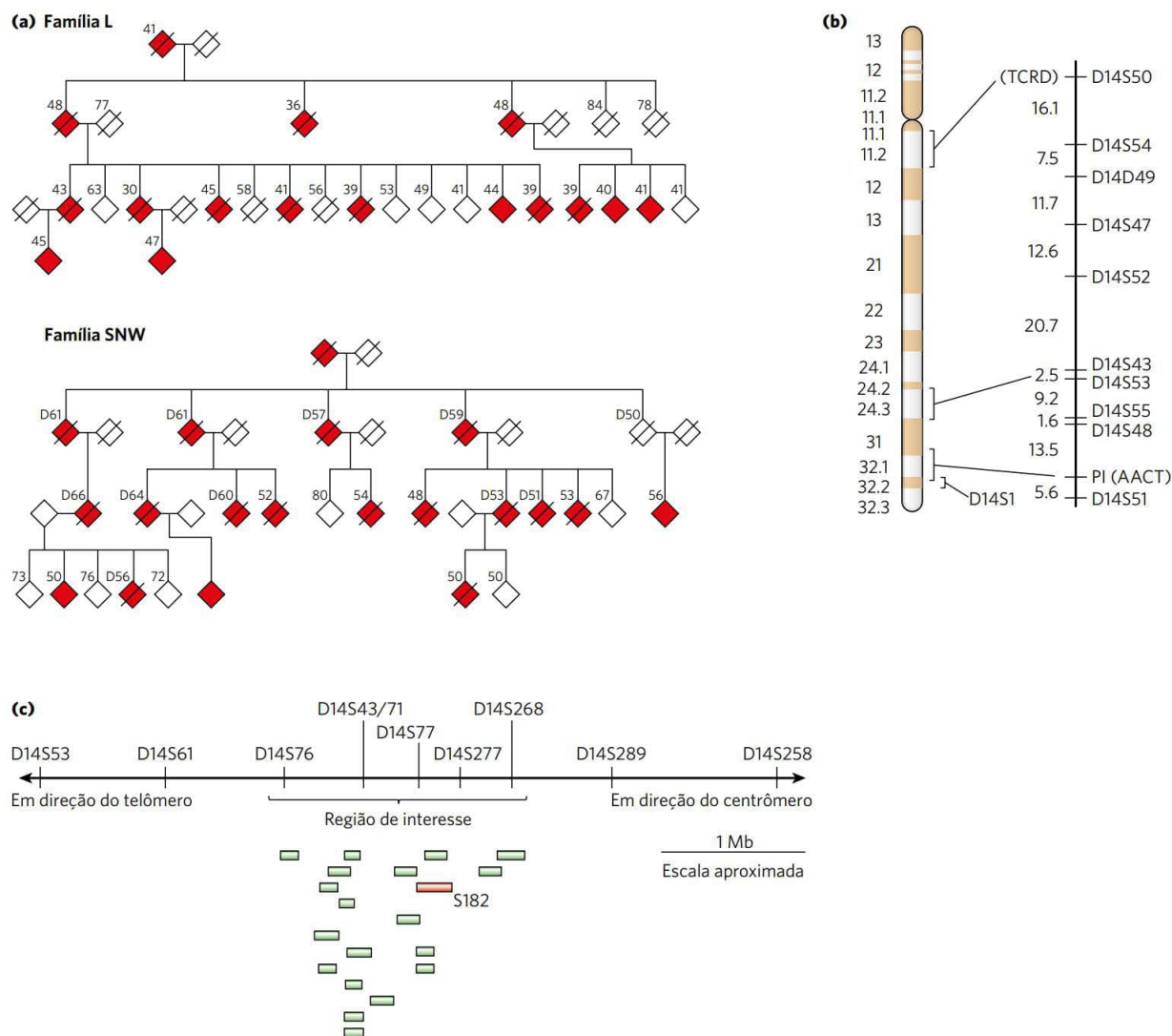


FIGURA 9-32 Análise de ligação na descoberta de genes de doenças. (a) Estes heredogramas para duas famílias afetadas pelo início precoce da doença de Alzheimer se baseiam nos dados disponíveis no momento do estudo. Os símbolos vermelhos representam os indivíduos afetados; as barras indicam as mortes antes ou logo no início do estudo. O número acima de cada símbolo corresponde à idade da pessoa, tanto no tempo do estudo quanto no momento da morte (indicada com a letra D). Para proteger a privacidade da família, o gênero não é indicado. (b) Cromossomo 14, com bandas criadas por alguns corantes. As posições dos marcadores cromossômicos são mostradas à direita, com a distância genética entre eles em centimorgans, uma medida de distância genética que reflete a frequência de recombinação entre os marcadores. O *TCRD* (receptor delta de célula T) e o *PI* (AACT [α 1-antiquimotripsina 1]), dois genes com alterações na população humana, foram usados juntamente com SNPs como marcadores no mapeamento cromossômico. (c) Ao comparar o DNA de membros da família afetados e não afetados, os pesquisadores finalmente definiram uma região de interesse perto do marcador D14S43 que contém 19 genes expressos. O gene marcado S182 (em vermelho) codifica a presenilina 1. (1 Mb = 10^6 pares de bases.) [Fontes: (a, b) informação de G. D. Schellenberg et al., *Science* 258:668, 1992. (c) Informação de R. Sherrington et al., *Nature* 375:754, 1995.]

genes que codificam diferentes hemoglobinas: mais de 1.000 variantes mutacionais conhecidas estão presentes na população humana. Algumas dessas variantes são inócuas; algumas causam doenças que vão desde doença falciforme até talassemias. A herança de genes mutantes específicos pode ser concentrada em famílias ou em populações isoladas.

Mais complexos são os casos em que uma condição de doença é causada por mutações em dois genes diferentes (nenhum dos quais, sozinho, causa a doença), ou nos quais uma condição particular é aumentada por uma mutação inócua em

outro gene. Identificar os genes e as mutações responsáveis por essas doenças digênicas é extremamente difícil, e, às vezes, essas doenças podem ser documentadas apenas em populações pequenas, isoladas e altamente endogâmicas.

Bancos de dados de genoma modernos estão abrindo caminhos alternativos para a identificação de genes de doenças. Em muitos casos, já temos informações bioquímicas sobre a doença. No caso da doença de Alzheimer de início precoce, um acúmulo da proteína β amiloide nos córtices límbicos e de associação do cérebro é, pelo menos parcial-

mente, responsável pelos sintomas. Defeitos na presenilina 1 (e em uma proteína relacionada, a presenilina 2, codificada por um gene no cromossomo 1) levam a níveis corticais elevados de proteína β amiloide. Estão sendo desenvolvidos bancos de dados focados que catalogam essas informações funcionais sobre os produtos de proteínas dos genes e sobre redes de interação de proteínas e localização de SNPs, juntamente com outros dados. O resultado é um caminho simplificado para a identificação de genes candidatos para uma doença específica. Se um pesquisador sabe um pouco sobre os tipos de enzimas ou outras proteínas que provavelmente contribuem para os sintomas da doença, esses bancos de dados podem gerar rapidamente uma lista de genes conhecidos para codificar proteínas com funções relevantes, uma lista de genes adicionais não caracterizados com relações parálogas ou ortológicas para esses genes, uma lista de proteínas conhecidas por interagir com as proteínas-alvo ou ortólogos em outros organismos e um mapa das posições dos genes. Muitas vezes, com o auxílio de dados de algumas linhagens familiares selecionadas, uma pequena lista de genes potencialmente relevantes pode ser rapidamente determinada.

Essas abordagens não se limitam a doenças humanas. Os mesmos métodos podem ser utilizados para identificar os genes envolvidos em doenças – ou genes que produzem características desejáveis – em outros animais e plantas. Claro, eles também podem ser usados para rastrear genes envolvidos em qualquer traço observável em que um pesquisador possa estar interessado. ■

Sequências no genoma informam sobre o passado do ser humano e fornecem oportunidades para o futuro

Cerca de 70 mil anos atrás, um pequeno grupo de seres humanos da África atravessou o Mar Vermelho em direção à Ásia. Talvez incentivados por alguma inovação na construção de pequenos barcos, ou conduzidos por conflitos ou fome, ou simplesmente curiosos, eles atravessaram a barreira de água. Essa colonização inicial, talvez envolvendo 1.000 indivíduos, começou uma jornada que só parou quando os seres humanos chegaram à Terra do Fogo (no extremo sul da América do Sul), muitos milhares de anos mais tarde. No processo, populações estabelecidas de expansões anteriores de homínídeos na Eurásia, incluindo o *Homo neanderthalensis*, foram deslocadas. Os neandertais desapareceram, assim como outras linhas de homínídeos haviam desaparecido antes deles.

A história do aparecimento dos seres humanos modernos pela primeira vez na África algumas centenas de milhares de anos atrás, e suas migrações à medida que eles por fim se irradiaram para fora de África, está escrita no DNA. Sequências genômicas de várias espécies trouxeram a evolução dos primatas e dos homínídeos para um foco mais nítido. Utilizando haplótipos presentes em populações humanas existentes, é possível traçar as migrações dos intrépidos antepassados humanos em todo o planeta (**Figura 9-33a**). Os neandertais não foram simplesmente deslocados; alguma mistura ocorreu (**Figura 9-33b**). Utilizando-se

QUADRO 9-2 Conhecendo o parente mais próximo da humanidade

Os seres humanos modernos e os neandertais conviveram na Europa e na Ásia há relativamente recentes 30 mil anos. As populações ancestrais humanas e neandertais divergiram há cerca de 370 mil anos, antes do aparecimento dos seres humanos anatomicamente modernos. Os neandertais utilizavam ferramentas, viviam em pequenos grupos e enterravam seus mortos. Dos parentes homínídeos conhecidos dos seres humanos modernos, os neandertais são os mais próximos. Durante centenas de milênios, eles habitaram grande parte da Europa e da Ásia Ocidental (**Figura Q-1**). Se o genoma do chimpanzé pode nos dizer algo sobre o que é ser humano, o genoma do neandertal pode nos dizer mais. Enterrados nos ossos e em outros restos retirados de locais de sepultamento estão

fragmentos de DNA genômico do neandertal. As tecnologias desenvolvidas para uso na ciência forense (ver Quadro 8-1) e os estudos do DNA ancestral foram combinados para iniciar um projeto de genoma do neandertal.

Esse esforço é diferente dos projetos genoma que visam espécies existentes. O DNA neandertal está presente



FIGURA Q-1 Os neandertais ocuparam grande parte da Europa e da Ásia Ocidental até cerca de 30 mil anos atrás. Os principais sítios arqueológicos neandertais estão aqui mostrados. (Observe que o grupo foi assim chamado por causa do sítio em Neanderthal, na Alemanha.)

(continua)

QUADRO 9-2 Conhecendo o parente mais próximo da humanidade (*Continuação*)

em pequenas quantidades contaminadas com o DNA de outros animais e de bactérias. Como se pode chegar até ele e como estar certo de que as sequências são realmente de neandertais? As respostas foram reveladas por aplicações inovadoras da biotecnologia. Essencialmente, as pequenas quantidades de fragmentos de DNA encontradas em um osso neandertal ou outros restos são clonadas em uma biblioteca, e os segmentos de DNA são sequenciados de forma aleatória, inclusive os contaminantes. Os resultados do sequenciamento são comparados com o banco de dados do genoma humano e do chimpanzé existentes. Os segmentos derivados de DNA neandertal são rapidamente diferenciados dos segmentos derivados de bactérias ou insetos por análise computadorizada, uma vez que eles têm sequências bastante relacionadas ao DNA humano e do chimpanzé. Quando uma coleção de segmentos de DNA neandertal é sequenciada, pode ser utilizada como sonda para identificar os fragmentos de sequência em amostras antigas que se sobrepõem a esses fragmentos conhecidos. O potencial problema de contaminação com o DNA humano moderno bastante relacionado pode ser controlado pela análise do DNA mitocondrial. As populações humanas têm haplótipos facilmente identificáveis (conjuntos distintos de diferenças genômicas; ver Figura 9-28) no seu DNA mitocondrial, e a análise de amostras de neandertais mostrou que o DNA mitocondrial neandertal tem seus próprios haplótipos distintos. A presença nas amostras neandertais de algumas diferenças encontradas em pares de bases no banco de dados do chimpanzé, mas não no banco de dados humano, é mais uma evidência de que as sequências de homínídeos não humanos foram encontradas.

Uma sequência genômica de Neandertal de alta qualidade foi finalizada, e mais estão a caminho. Os dados fornecem evidências de que os seres humanos modernos e os neandertais que foram a fonte desse DNA compartilharam um ancestral comum cerca de 700 mil anos atrás (Figura Q-2). A análise do DNA mitocondrial sugere que os dois grupos continuaram no mesmo caminho, com algum fluxo gênico entre eles, ao longo de mais 300 mil anos. As linhas dividem-se com o surgimento de seres humanos anatomicamente modernos, embora haja evidências atuais de alguma mistura das linhas um pouco mais tarde, à medida que os seres humanos se espalharam pela Eurásia.

Bibliotecas expandidas de DNA neandertal de diferentes conjuntos de restos mortais devem finalmente permitir uma análise da diversidade genética neandertal

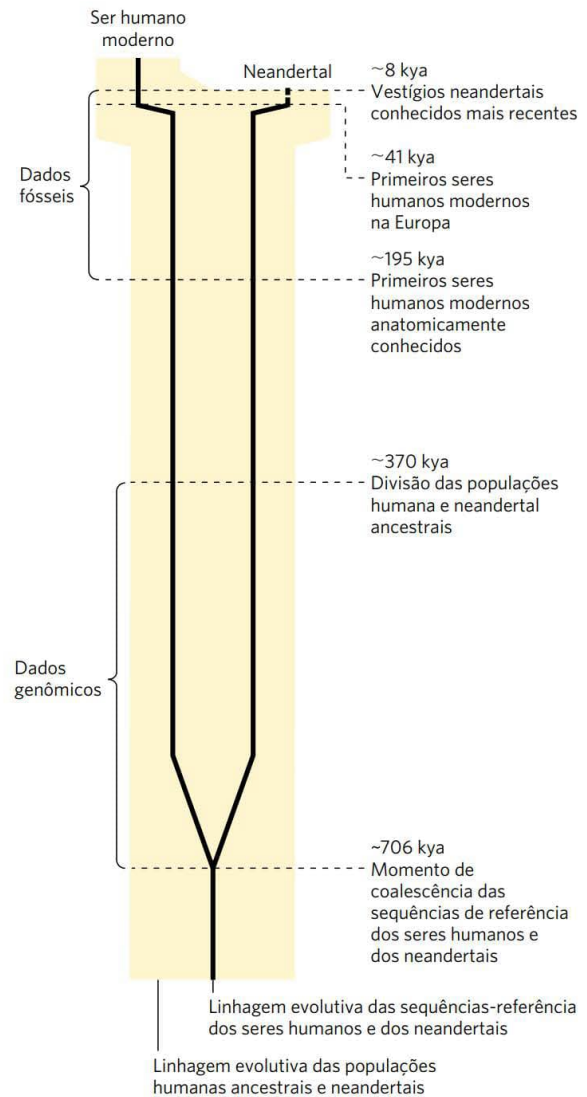


FIGURA Q-2 Esta linha do tempo mostra a divergência das sequências genômicas (linhas pretas) humanas e neandertais e das populações humanas ancestrais e neandertais (em amarelo). Os dados genômicos fornecem evidências para alguma intermistura das populações até cerca de 45 mil anos atrás. Eventos-chave na evolução humana estão marcados. [Fonte: informação de J. P. Noonan et al., *Science* 314:1113, 2006.]

e, talvez, de migrações de neandertais, oferecendo um fascinante olhar sobre o nosso passado homínídeo.

métodos sensíveis com base em PCR, agora está disponível uma sequência quase completa do genoma de neandertais (Quadro 9-2). Sabemos que cerca de 5% do genoma da maioria dos seres humanos não africanos é derivado dos neandertais. Algumas populações humanas também adquiriram o DNA genômico de outro grupo recentemente descoberto, os denisovanos. O DNA de neandertais forne-

ceu aos seres humanos um sistema imune mais complexo, tornando-nos mais resistentes à infecção, mas também um pouco mais suscetíveis a doenças autoimunes. A história do passado do ser humano está gradualmente tomando forma à medida que mais genomas humanos, dos vivos hoje e daqueles que viveram em milênios passados, estão sendo reunidos.

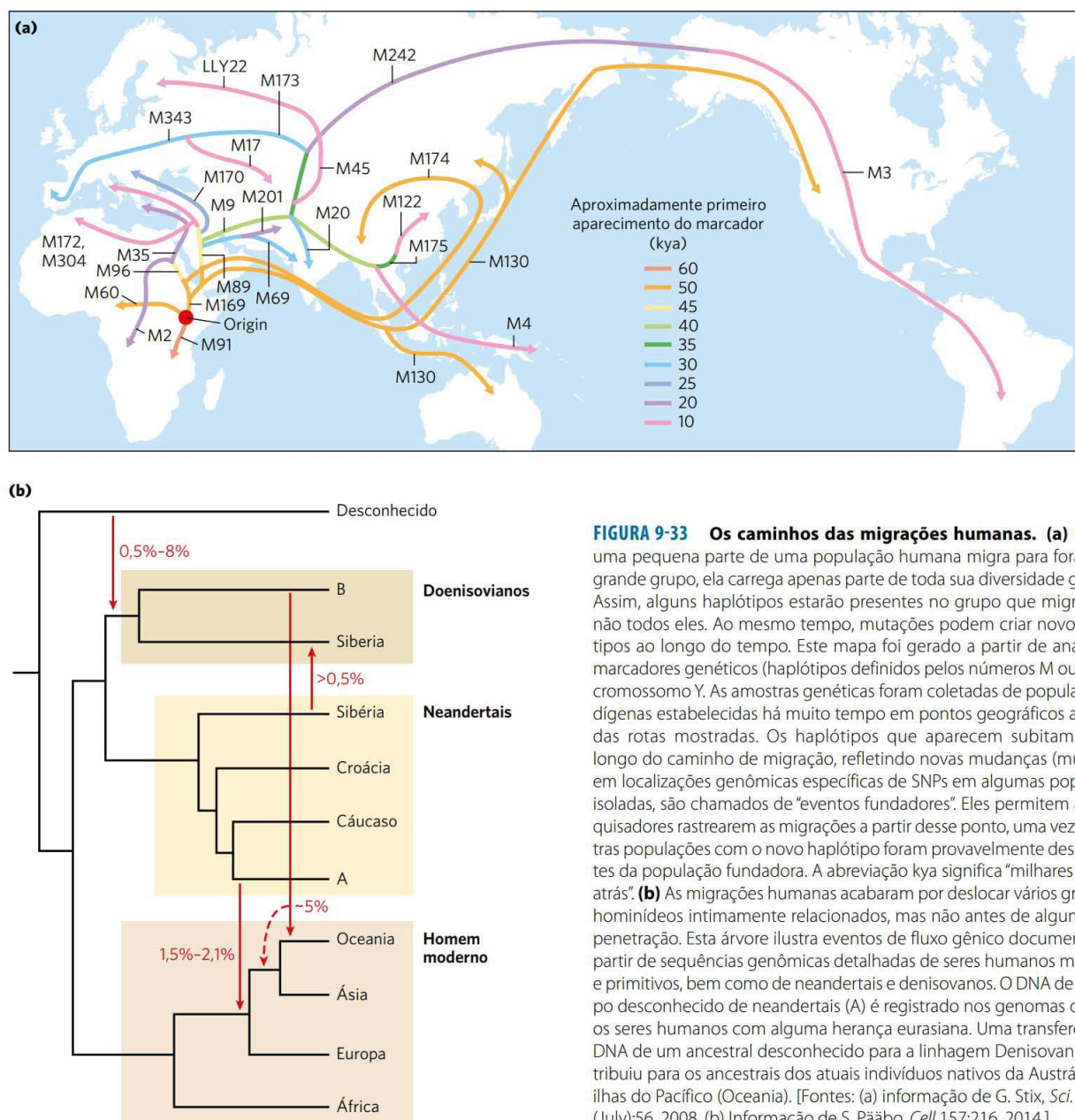


FIGURA 9-33 Os caminhos das migrações humanas. **(a)** Quando uma pequena parte de uma população humana migra para fora de um grande grupo, ela carrega apenas parte de toda sua diversidade genética. Assim, alguns haplótipos estarão presentes no grupo que migrou, mas não todos eles. Ao mesmo tempo, mutações podem criar novos haplótipos ao longo do tempo. Este mapa foi gerado a partir de análises de marcadores genéticos (haplótipos definidos pelos números M ou LLY) no cromossomo Y. As amostras genéticas foram coletadas de populações indígenas estabelecidas há muito tempo em pontos geográficos ao longo das rotas mostradas. Os haplótipos que aparecem subitamente ao longo do caminho de migração, refletindo novas mudanças (mutações) em localizações genômicas específicas de SNPs em algumas populações isoladas, são chamados de “eventos fundadores”. Eles permitem aos pesquisadores rastrear as migrações a partir desse ponto, uma vez que outras populações com o novo haplótipo foram provavelmente descendentes da população fundadora. A abreviação kya significa “milhares de anos atrás”. **(b)** As migrações humanas acabaram por deslocar vários grupos de hominídeos intimamente relacionados, mas não antes de alguma interpenetração. Esta árvore ilustra eventos de fluxo gênico documentados a partir de sequências genômicas detalhadas de seres humanos modernos e primitivos, bem como de neandertais e denisovanos. O DNA de um grupo desconhecido de neandertais (A) é registrado nos genomas de todos os seres humanos com alguma herança eurasiática. Uma transferência de DNA de um ancestral desconhecido para a linhagem Denisovan (B) contribuiu para os ancestrais dos atuais indivíduos nativos da Austrália e das ilhas do Pacífico (Oceania). [Fontes: (a) informação de G. Stix, *Sci. Am.* 299 (July):56, 2008. (b) Informação de S. Pääbo, *Cell* 157:216, 2014.]

A promessa médica de sequências genômicas personalizadas cresce à medida que os custos de sequenciamento continuam a diminuir e mais genes subjacentes a doenças hereditárias são definidos. O conhecimento de sequências genômicas também oferece a possibilidade de alterá-los. Atualmente, é comum modificar sequências de DNA de organismos a partir de bactérias e leveduras para plantas e mamíferos para fins de pesquisa e comercialização. Os esforços para curar doenças humanas hereditárias com terapia gênica ainda não atingiram todo seu potencial, mas tecnologias para o fornecimento de genes estão constantemente se aperfeiçoando. Poucas disciplinas científicas afetarão o futuro da espécie humana mais do que a genômica moderna.

RESUMO 9.3 Genômica e a história da humanidade

- Cerca de 30% do DNA no genoma humano está nos éxons e nos íntrons dos genes que codificam proteínas. Cerca de metade do DNA é derivada de transposons parasitas. Muito do restante codifica RNA de muitos tipos. Sequências repetidas simples compõem o centrômero e os telômeros.
- As alterações de genes que definem a humanidade podem ser discernidas em parte pela genômica comparativa utilizando-se outros primatas.
- A genômica comparativa também é utilizada para localizar as alterações no gene que definem doenças hereditárias e pode ser utilizada para estudar a evolução e a migração de nossos ancestrais humanos ao longo de milênios.

Termos-chave

Termos em negrito estão definidos no glossário.

genoma 319	biblioteca de DNA 335
genômica 319	biblioteca genômica 335
biologia de sistemas 319	DNA complementar (cDNA) 335
clonagem 320	biblioteca de cDNA 335
vetor 320	genômica comparativa 335
DNA recombinante 320	ortólogos 335
tecnologia do DNA	parálogos 335
recombinante 320	sintenia 335
engenharia genética 320	marcador de epítipo 338
endonucleases de restrição 321	análise de duplo-híbrido em
DNA-ligasas 321	leveduras 340
plasmídeo 324	microarranjo de DNA 341
cromossomo artificial	CRISPR/Cas 342
bacteriano (BAC) 325	RNA-guia (gRNA)
cromossomo artificial de	RNA 342
leveduras (YAC) 326	CRISPR transativador (tracrRNA) 342
vetor de expressão 328	RNA-guia simples (sgRNA) 343
baculovírus 329	anotação genômica 346
bacmídeo 329	polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) 347
mutagênese sítio-dirigida 330	haplótipo 348
proteína de fusão 332	
marcador 332	
PCR quantitativa (qPCR) 333	

Teste seu conhecimento

1. Produção de DNA clonado Quando liga dois ou mais fragmentos de DNA, um pesquisador pode ajustar a sequência na junção de vários modos diferentes, como será visto nos exercícios a seguir.

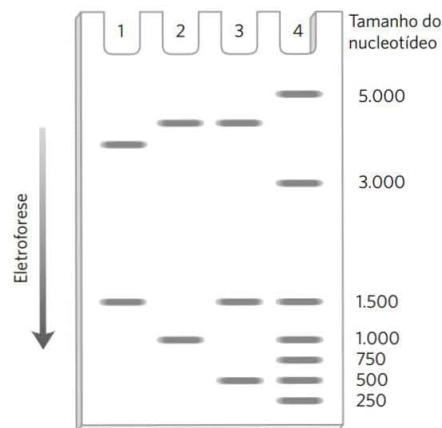
- Desenhe a estrutura de cada extremidade de um fragmento de DNA linear produzido pela digestão com a enzima de restrição EcoRI (incluindo aquelas sequências remanescentes da sequência de reconhecimento EcoRI).
- Desenhe a estrutura resultante da reação dessa sequência final com a DNA-polimerase I e os quatro desoxinucleosídeos trifosfatos (ver Figura 8-34).
- Desenhe a sequência produzida na junção que se forma se as duas extremidades com a estrutura obtida em (b) forem ligadas (ver Figura 25-16).
- Desenhe a estrutura produzida se a estrutura obtida em (a) for tratada com uma nuclease que degrade apenas DNA de fita simples.
- Desenhe a sequência da junção produzida se uma extremidade com a estrutura (b) for ligada a uma extremidade com a estrutura (d).
- Desenhe a estrutura da extremidade de um fragmento de DNA linear que foi produzido por uma digestão com a enzima de restrição PvuII (incluindo aquelas sequências remanescentes da sequência de reconhecimento PvuII).
- Desenhe a sequência da junção produzida se uma extremidade com estrutura (b) estiver ligada a uma extremidade com a estrutura (f).

- Suponha que você sintetize um fragmento de DNA duplo curto com qualquer sequência desejada. Com este fragmento sintético e os procedimentos descritos em (a) até (g), desenhe um protocolo que remova um sítio de restrição EcoRI de uma molécula de DNA e incorpore um novo sítio de restrição BamHI aproximadamente na mesma localização (ver Figura 9-2).
- Desenhe quatro diferentes fragmentos de DNA de dupla-fita sintéticos curtos que permitam a ligação da estrutura (a) com um fragmento de DNA produzido por digestão com a enzima de restrição PstI. Em um desses fragmentos, projete a sequência de modo que a junção final contenha as sequências de reconhecimento para ambos, EcoRI e PstI. No segundo e terceiro fragmentos, projete a sequência de forma que a junção contenha apenas a sequência de reconhecimento EcoRI e apenas PstI, respectivamente. Projete a sequência do quarto fragmento de modo que nem a sequência EcoRI nem a PstI apareçam na junção.

2. Seleção de plasmídeos recombinantes Quando se clona um fragmento de DNA exógeno em um plasmídeo, é frequentemente útil inserir o fragmento em um sítio que interrompa um marcador de seleção (como o gene de resistência à tetraciclina de pBR322). A perda da função do gene interrompido pode ser utilizada para identificar os clones que contêm os plasmídeos recombinantes com o DNA exógeno. Com um vetor de cromossomo artificial de levedura (YAC), não é necessário fazer isso; o pesquisador ainda pode distinguir vetores que incorporam grandes fragmentos de DNA exógenos daqueles que não o fazem. Como esses vetores recombinantes podem ser identificados?

3. Clonagem de DNA O vetor de clonagem do plasmídeo pBR322 (ver Figura 9-3) é clivado com a endonuclease de restrição PstI. Um fragmento de DNA isolado de um genoma eucariótico (também produzido por clivagem com PstI) é adicionado ao vetor preparado e ligado. A mistura de DNA ligado é, então, utilizada para transformar bactérias, e as bactérias que contêm os plasmídeos são selecionadas pelo crescimento em presença de tetraciclina.

- Além do plasmídeo recombinante desejado, quais outros tipos de plasmídeos podem ser encontrados entre as bactérias transformadas que são resistentes à tetraciclina? Como eles podem ser diferenciados?
- O fragmento de DNA clonado tem 1.000 pb e apresenta um sítio de restrição para EcoRI a 250 pb de uma extremidade. Três diferentes plasmídeos recombinantes foram clivados com EcoRI e analisados por eletroforese em gel, dando os padrões mostrados abaixo. O que cada padrão de restrição



10. Análise do duplo-híbrido em leveduras Você é um pesquisador que acaba de descobrir uma nova proteína em um fungo. Planeje um experimento de duplo-híbrido em leveduras para identificar as outras proteínas na célula do fungo com as quais essa nova proteína interage e explique como isso pode ajudá-lo a determinar a função da sua proteína.

11. Uso da fotolitografia para fazer um microarranjo de DNA A Figura 9-22 mostra os primeiros passos no processo de produção de um microarranjo, ou *chip* de DNA, usando fotolitografia. Descreva os próximos passos necessários para a obtenção das sequências desejadas (sequência de quatro nucleotídeos diferentes em cada um dos quatro pontos) mostrada no primeiro painel da figura. Após cada etapa, mostre a sequência de nucleotídeos resultante ligada a cada posição.

12. Uso de grupos externos em genômica comparativa Uma proteína hipotética encontrada em seres humanos, orangotangos e chimpanzés tem as seguintes sequências (vermelho indica diferenças de resíduos de aminoácidos; traços indicam uma deleção – os resíduos que estão faltando naquela sequência):

Ser humano: ATSAAGYDEWEGGKVLHL – – KLQNRGALL
ELDIGAV

Orangotango: ATSAAGWDEWEGGKVLHL^{DK}KLQNRGALL
ELDIGAV

Chimpanzé: ATSAAGWDEWEGGK^{LIHL}^{DK}KLQNRGALL
ELDIGAV

Qual é a sequência mais provável da proteína presente no último ancestral comum do ser humano e do chimpanzé?

13. Migrações humanas I Populações nativas americanas na América do Norte e do Sul têm haplótipos de DNA mitocondrial que podem ser rastreados até populações no nordeste da Ásia. As populações aleúte e esquimó nas partes mais ao norte da América do Norte apresentam um subconjunto dos mesmos haplótipos que ligam outros nativos americanos à Ásia e possuem vários haplótipos que podem ser rastreados até as origens asiáticas, mas não são encontrados em populações nativas em outras partes das Américas. Forneça uma explicação possível.

14. Migrações humanas II O DNA (haplótipos) originário dos Denisovans pode ser encontrado nos genomas de indígenas australianos e ilhéus melanésios. No entanto, os mesmos marcadores de DNA não são encontrados nos genomas de pessoas nativas da África. Explique.



15. Encontrando genes de doenças Você é um caçador de genes tentando encontrar a base genética de uma doença hereditária rara. O exame de seis linhagens de famílias afetadas pela doença fornece resultados inconsistentes. Para duas das famílias, a doença é co-herdada com marcadores no cromossomo 7. Para as outras quatro famílias, a doença é co-herdada com marcadores no cromossomo 12. Explique como essa diferença pode ter surgido.

Problema de análise de dados

16. HincII: a primeira endonuclease de restrição A descoberta da primeira endonuclease de restrição e o seu uso

prático foram descritos em dois artigos científicos publicados em 1970. No primeiro trabalho, Smith e Wilcox descreveram o isolamento de uma enzima que clivava o DNA de dupla-fita. Eles inicialmente demonstraram a atividade de nuclease da enzima medindo a redução da viscosidade de amostras de DNA tratadas com essa enzima.

(a) Por que o tratamento com a nuclease reduz a viscosidade de uma solução de DNA?

Os autores determinaram se a enzima era uma endonuclease ou uma exonuclease por meio do tratamento da enzima com DNA marcado com ^{32}P e, em seguida, adicionando ácido tricloroacético (TCA). Nessas condições utilizadas em seus experimentos, os nucleotídeos livres são solúveis em TCA enquanto os oligonucleotídeos precipitam.

(b) Não se formou nenhum material marcado com ^{32}P solúvel em TCA após o tratamento do DNA marcado com ^{32}P com a nuclease. Com base nesse resultado, essa enzima é uma endonuclease ou uma exonuclease? Explique o raciocínio utilizado.

Quando um polinucleotídeo é clivado, o fosfato geralmente não é removido e permanece ligado na extremidade 5' ou 3' do fragmento de DNA resultante. Smith e Wilcox determinaram a localização do fosfato no fragmento formado pela nuclease nas seguintes etapas:

1. Tratar o DNA não marcado com a nuclease.
2. Tratar uma amostra (A) do produto com γ - ^{32}P -ATP e polinucleotídeo-cinase (que pode ligar o γ -fosfato do ATP a uma 5'-OH, mas não para um 5'-fosfato ou para 3'-OH ou 3'-fosfato). Medir a quantidade de ^{32}P incorporado no DNA.
3. Tratar outra amostra (B) do produto da etapa 1 com fosfatase alcalina (que remove grupos fosfato das extremidades 5 e 3 livres) seguida por polinucleotídeo-cinase e γ - ^{32}P -ATP. Medir a quantidade de ^{32}P incorporado no DNA.

(c) Smith e Wilcox descobriram que a amostra A tinha 136 contagens/minuto de ^{32}P ; a amostra B tinha 3.740 contagens/minuto. A clivagem pela nuclease deixou o fosfato na extremidade 5' ou 3' dos fragmentos de DNA? Explique o raciocínio utilizado.

(d) O tratamento do DNA do bacteriófago T7 com a nuclease gerou cerca de 40 fragmentos específicos de comprimentos variados. Como esse resultado pode ser consistente com o fato de a enzima reconhecer uma sequência específica no DNA, em vez de realizar uma clivagem da dupla-fita em regiões aleatórias?

Nesse ponto, havia duas possibilidades para a clivagem sítio-específica: a clivagem poderia ocorrer no sítio de reconhecimento (1) ou próxima ao sítio de reconhecimento (2), mas não dentro da sequência reconhecida. Para direcionar essa investigação, Kelly e Smith determinaram a sequência das extremidades 5' dos fragmentos de DNA gerados pela nuclease, nas seguintes etapas:

1. Tratar o DNA do fago T7 com a enzima.
2. Tratar os fragmentos resultantes com fosfatase alcalina para remover os fosfatos da extremidade 5'.
3. Tratar os fragmentos desfosforilados com polinucleotídeo-cinase e γ - ^{32}P -ATP para marcar a extremidade 5'.
4. Tratar as moléculas marcadas com DNases para quebrá-las em uma mistura de mono, bi e trinucleotídeos.

5. Determinar a sequência dos mono, bi e trinucleotídeos marcados comparando-os com oligonucleotídeos de sequência conhecida por cromatografia de camada delgada.

Os produtos marcados foram identificados como: mononucleotídeos: A e G; dinucleotídeos: (5') ApA (3') e (5') GpA (3'); trinucleotídeos: (5') ApApC (3') e (5') GpApC (3').

- (e) Qual modelo de clivagem é consistente com esses resultados? Explique o raciocínio utilizado.

Kelly e Smith tentaram determinar a sequência das extremidades 3' dos fragmentos. Constataram uma mistura de (5') TpC (3') e (5') TpT (3'). Eles não determinaram a sequência de nenhum dos trinucleotídeos na extremidade 3'.

- (f) Com base nesses dados, qual é a sequência de reconhecimento para a nuclease e em qual ponto na sequência o esqueleto de DNA é clivado? Utilize a Tabela 9-2 como modelo para sua resposta.

Referências

Kelly, T.J. e H.O. Smith. 1970. A restriction enzyme from *Haemophilus influenzae*: II. Base sequence of the recognition site. *J. Mol. Biol.* 51:393–409.

Smith, H.O. e K.W. Wilcox. 1970. A restriction enzyme from *Haemophilus influenzae*: I. Purification and general properties. *J. Mol. Biol.* 51:379–391.

Esta página foi deixada em branco intencionalmente.

Lipídeos

- 10.1 Lipídeos de armazenamento 361
- 10.2 Lipídeos estruturais em membranas 366
- 10.3 Lipídeos como sinalizadores, cofatores e pigmentos 374
- 10.4 Trabalhando com lipídeos 381

Os lipídeos biológicos são um grupo de compostos quimicamente diversos, definidos por uma característica em comum: a insolubilidade em água. As funções biológicas dos lipídeos são tão diversas quanto a sua química. Gorduras e óleos são as principais formas de armazenamento de energia em muitos organismos. Os fosfolipídeos e os esteróis são os principais elementos estruturais das membranas biológicas. Outros lipídeos, embora presentes em quantidades relativamente pequenas, desempenham papéis cruciais como cofatores enzimáticos, transportadores de elétrons, pigmentos fotossensíveis, âncoras hidrofóbicas para proteínas, chaperonas para auxiliar no enovelamento de proteínas de membrana, agentes emulsificantes no trato digestório, hormônios e mensageiros intracelulares. Este capítulo apresenta os lipídeos mais representativos de cada um dos tipos, organizados de acordo com suas funções, com ênfase na estrutura química e nas propriedades físicas. Embora o texto siga uma organização funcional, os milhares de lipídeos diferentes também podem ser organizados em oito categorias gerais de acordo com sua estrutura química (ver Tabela 10-2). A geração de energia pela oxidação de lipídeos será abordada no Capítulo 17 e sua síntese, no Capítulo 21.

10.1 Lipídeos de armazenamento

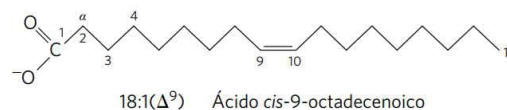
As gorduras e os óleos utilizados de modo quase universal como formas de armazenamento de energia nos organismos vivos são derivados de **ácidos graxos**. Os ácidos graxos são derivados de hidrocarbonetos, com estado de oxidação quase tão baixo (i.e., altamente reduzido) quanto os hidrocarbonetos nos combustíveis fósseis. A oxidação celular de ácidos graxos (a CO_2 e H_2O), assim como a combustão controlada e rápida de combustíveis fósseis em motores de combustão interna, é altamente exergônica.

Neste capítulo são apresentadas as estruturas e a nomenclatura dos ácidos graxos mais encontrados em organismos vivos. Dois tipos de compostos que contêm ácidos graxos, os triacilgliceróis e as ceras, são descritos para ilustrar a diversidade de estrutura e de propriedades físicas dessa família de compostos.

Os ácidos graxos são derivados de hidrocarbonetos

Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos com cadeias hidrocarbonadas de comprimento variando de 4 a 36 carbonos (C_4 a C_{36}). Em alguns ácidos graxos, essa cadeia é totalmente saturada (não contém ligações duplas) e não ramificada; em outros, a cadeia contém uma ou mais ligações duplas (Tabela 10-1). Alguns poucos contêm anéis de três carbonos, grupos hidroxila ou ramificações de grupos metila.

>> Convenção-chave: uma nomenclatura simplificada para ácidos graxos não ramificados especifica o número de carbonos na cadeia e o número de ligações duplas, separados por uma vírgula. Por exemplo, o ácido palmítico, com 16 carbonos e saturado, é abreviado 16:0, e o ácido oleico, com 18 carbonos (ácido octadecenoico), com uma ligação dupla (mostrado abaixo), é 18:1. Cada segmento do zigue-zague na estrutura representa uma única ligação entre carbonos adjacentes. O carbono da carboxila é considerado o primeiro carbono (C-1) e o próximo carbono é C-2. As posições de quaisquer ligações duplas, designadas por Δ (delta), são especificadas em relação a C-1 por um número sobrescrito indicando o carbono com menor número na ligação dupla. Por esta convenção, o ácido oleico, com uma ligação dupla entre C-9 e C-10, é designado 18:1(Δ^9); um ácido graxo de 20 carbonos, com uma ligação dupla entre C-9 e C-10 e outra entre C-12 e C-13, é designado 20:2($\Delta^{9,12}$).



Os ácidos graxos de ocorrência mais comum apresentam um número par de átomos de carbono em uma cadeia não ramificada de 12 a 24 carbonos (Tabela 10-1). Como será visto no Capítulo 21, o número par de carbonos resulta do modo como esses compostos são sintetizados, o que envolve condensações sucessivas de unidades de dois carbonos (acetato).

Também há um padrão comum na localização das ligações duplas; na maioria dos ácidos graxos monoinsaturados, a ligação dupla ocorre entre C-9 e C-10 (Δ^9), e as outras ligações duplas dos ácidos graxos poli-insaturados geralmente são Δ^{12} e Δ^{15} . (O ácido araquidônico é uma exceção a essa generalização; ver Tabela 10-1.) As ligações duplas dos ácidos graxos poli-insaturados quase nunca são conjugadas (ligações duplas e simples alternadas, como em

TABELA 10-1 Alguns ácidos graxos que ocorrem naturalmente: estrutura, propriedades e nomenclatura

Esqueleto de carbonos	Estrutura ^a	Nome sistemático ^b	Nome comum (origem)	Ponto de fusão (°C)	Solubilidade a 30°C (mg/g solvente)	
					Água	Benzeno
12:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COOH	Ácido <i>n</i> -dodecanoico	Ácido láurico (do latim, <i>laurus</i> , “árvore de louro”)	44,2	0,063	2.600
14:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COOH	Ácido <i>n</i> -tetradecanoico	Ácido mirístico (do latim, <i>Myristica</i> , gênero da noz-moscada)	53,9	0,024	874
16:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH	Ácido <i>n</i> -hexadecanoico	Ácido palmítico (do latim, <i>palma</i> , “palmeira”)	63,1	0,0083	348
18:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH	Ácido <i>n</i> -octadecanoico	Ácido esteárico (do grego, <i>stear</i> , “gordura dura”)	69,6	0,0034	124
20:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₈ COOH	Ácido <i>n</i> -eicosanoico	Ácido araquídico (do latim, <i>Arachis</i> , gênero de leguminosa)	76,5		
24:0	CH ₃ (CH ₂) ₂₂ COOH	Ácido <i>n</i> -tetracosanoico	Ácido lignocérico (do latim, <i>lignum</i> , “madeira” + <i>cera</i>)	86,0		
16:1(Δ ⁹)	CH ₃ (CH ₂) ₅ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	Ácido <i>cis</i> -9-hexadecenoico	Ácido palmitoleico	1 a -0,5		
18:1(Δ ⁹)	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	Ácido <i>cis</i> -9-octadecenoico	Ácido oleico (do latim, <i>oleum</i> , “óleo”)	13,4		
18:2(Δ ^{9,12})	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	Ácido <i>cis</i> -, <i>cis</i> -9,12-octadecadienoico	Ácido linoleico (do grego, <i>linon</i> , “linho”)	1-5		
18:3(Δ ^{9,12,15})	CH ₃ CH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	Ácido <i>cis</i> -, <i>cis</i> -, <i>cis</i> -9,12,15-octadecatrienoico	Ácido α-linolênico	-11		
20:4(Δ ^{5,8,11,14})	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH=CHCH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₃ COOH	Ácido <i>cis</i> -, <i>cis</i> -, <i>cis</i> -, <i>cis</i> -5,8,11,14-eicosatetraenoico	Ácido araquidônico	-49,5		

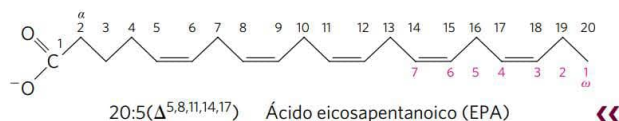
^aTodos os ácidos estão apresentados em sua forma não ionizada. Em pH 7, os ácidos graxos livres apresentam a carboxila ionizada. Observe que a numeração dos átomos de carbono começa no carbono da carboxila.

^bO prefixo *n*- indica a estrutura “normal”, não ramificada. Por exemplo, “dodecanoico” simplesmente indica 12 átomos de carbono, os quais poderiam estar dispostos em várias formas ramificadas; “*n*-dodecanoico” especifica a forma linear, não ramificada. Para ácidos graxos insaturados, a configuração de cada ligação dupla está indicada; em ácidos graxos biológicos, a configuração é quase sempre *cis*.

—CH=CH—CH=CH—), mas sim separadas por um grupo metileno: —CH=CH—CH₂—CH=CH—. Em quase todos os ácidos graxos insaturados que ocorrem naturalmente, as ligações duplas encontram-se em configuração *cis*. Ácidos graxos *trans* são produzidos pela fermentação no rúmen de animais leiteiros, e são obtidos dos laticínios e da carne.

>> Convenção-chave: a família de **ácidos graxos poli-insaturados (AGPI)** com uma ligação dupla entre o terceiro e o quarto carbono a partir da extremidade da cadeia com grupo metila é de importância especial na nutrição humana. Como o papel fisiológico dos ácidos graxos poli-insaturados está relacionado mais à posição da primeira ligação dupla próxima à extremidade da cadeia com o grupo *metila*, em vez de à extremidade contendo a carboxila, uma nomen-

clatura alternativa algumas vezes é utilizada para esses ácidos graxos. O carbono do grupo metila – ou seja, o carbono mais distante do grupo carboxila – é chamado de carbono ω (ômega; a última letra do alfabeto grego) e recebe o número 1 (C-1); nessa convenção, o carbono da carboxila recebe o número mais alto. As posições das ligações duplas são indicadas em relação ao carbono ω. Nessa convenção, os ácidos graxos poli-insaturados com uma ligação dupla entre C-3 e C-4 são chamados de **ácidos graxos ômega 3 (ω-3)** e aqueles com a ligação dupla entre C-6 e C-7 são **ácidos graxos ômega 6 (ω-6)**. A seguir, é mostrado o ácido eicosapentaenoico, que pode ser designado como 20:5(Δ^{5,8,11,14,17}) pela nomenclatura padrão, mas é também referido como um ácido graxo ômega 3, enfatizando a importância biológica da ligação dupla na posição ômega 3.



Os seres humanos necessitam do ácido graxo poli-insaturado ômega 3 α -linolênico (ALA; 18:3($\Delta^{9,12,15}$), na convenção-padrão), mas não têm a capacidade enzimática de sintetizá-lo e, portanto, devem obtê-lo da dieta. A partir do ALA, os seres humanos podem sintetizar dois outros ácidos graxos poli-insaturados ômega 3, importantes para as funções celulares: ácido eicosapentaenoico (EPA; 20:5($\Delta^{5,8,11,14,17}$), mostrado na convenção-chave, acima) e ácido docosaexanoico (DHA; 22:6($\Delta^{4,7,10,13,16,19}$)). Um desequilíbrio entre os AGPI ômega 6 e ômega 3 na dieta está associado a um risco aumentado de doenças cardiovasculares. A proporção ótima de AGPI ômega 6 para ômega 3 na dieta está entre 1:1 e 4:1, mas a proporção nas dietas da maioria dos norte-americanos está mais próxima de 10:1 a 30:1. A “dieta mediterrânea”, que tem sido associada com a diminuição do risco de doenças cardíacas, é mais rica em AGPI ômega 3, obtido em vegetais folhosos (saladas) e óleos de peixe. Esses óleos são especialmente ricos em EPA e DHA, e suplementos com óleo de peixe são frequentemente prescritos para indivíduos com histórico de doença cardiovascular. ■

As propriedades físicas dos ácidos graxos e dos compostos que os contêm são determinadas, em grande parte, pelo comprimento e pelo grau de insaturação da cadeia hidrocarbonada. A cadeia hidrocarbonada apolar é responsável pela baixa solubilidade dos ácidos graxos na água. O ácido láurico (12:0, M_r 200), por exemplo, tem solubilidade em água de 0,063 mg/g – muito menor do que a da glicose (M_r 180), que é de 1.100 mg/g. Quanto mais longa for a cadeia acila do ácido graxo e quanto menos ligações duplas ela tiver, mais baixa é a solubilidade em água. O grupo ácido carboxílico é polar (e ionizado em pH neutro) e é responsável pela leve solubilidade dos ácidos graxos de cadeia curta em água.

Os pontos de fusão também são muito influenciados pelo comprimento e pelo grau de insaturação da cadeia hidrocarbonada. À temperatura ambiente (25°C), os ácidos graxos saturados de 12:0 a 24:0 têm consistência de cera, ao passo que os ácidos graxos insaturados de mesmo comprimento são líquidos oleosos. Essa diferença nos pontos de fusão deve-se a diferentes graus de empacotamento das moléculas dos ácidos graxos (Figura 10-1). Nos compostos completamente saturados, a rotação livre em torno de cada ligação carbono-carbono dá grande flexibilidade à cadeia hidrocarbonada; a conformação mais estável é a forma completamente estendida, na qual o impedimento estérico dos átomos vizinhos é minimizado. Essas moléculas podem se agrupar de forma compacta em arranjos quase cristalinos, com os átomos ao longo de todo o seu comprimento em interações de van der Waals com os átomos de moléculas vizinhas. Em ácidos graxos insaturados, uma ligação dupla *cis* força uma dobra na cadeia hidrocarbonada. Ácidos graxos com uma ou várias dessas dobras não podem se agrupar tão firmemente quanto os ácidos graxos totalmente saturados, e as interações entre eles são, portanto, mais fracas. Como é necessário menos energia térmica para desorganizar esses arranjos fracamente ordenados dos ácidos graxos insatura-

dos, eles têm pontos de fusão consideravelmente mais baixos que os ácidos graxos saturados de mesmo comprimento de cadeia (Tabela 10-1).

Em vertebrados, os ácidos graxos livres (ácidos graxos não esterificados, com um grupo carboxilato livre) circulam no sangue ligados de modo não covalente a uma proteína carreadora, a albumina sérica. No entanto, ácidos graxos estão presentes no plasma sanguíneo principalmente como derivados de ácidos carboxílicos: como ésteres ou amidas. Devido à ausência do grupo carboxilato carregado, esses derivados de ácidos graxos geralmente são ainda menos solúveis em água do que os ácidos graxos livres.

Os triacilgliceróis são ésteres de ácidos graxos e glicerol

Os lipídeos mais simples construídos a partir de ácidos graxos são os **triacilgliceróis**, também chamados de triglicerídeos, gorduras ou gorduras neutras. Os triacilgliceróis são compostos por três ácidos graxos, cada um em ligação éster com uma única molécula de glicerol (Figura 10-2). Aqueles que contêm o mesmo tipo de ácido graxo em todas as três posições são chamados de triacilgliceróis simples, e sua nomenclatura é derivada do ácido graxo que contêm. Os triacilgliceróis simples de 16:0, 18:0 e 18:1, por exemplo, são tripalmitina, triestearina e trioleína, respectivamente. A maioria dos triacilgliceróis de ocorrência natural é mista,

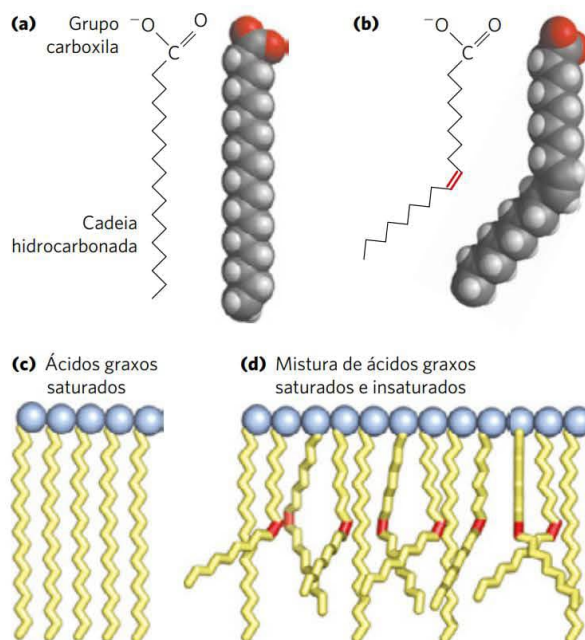


FIGURA 10-1 O empacotamento de ácidos graxos em agregados estáveis. A extensão do empacotamento depende do grau de saturação. **(a)** Duas representações do ácido esteárico, um ácido completamente saturado, 18:0 (estearato em pH 7), em sua conformação normal estendida. **(b)** A ligação dupla *cis* (em vermelho) no ácido oleico, 18:1(Δ^9) (oleato), restringe a rotação e introduz uma dobra rígida na cauda hidrocarbonada. Todas as outras ligações na cadeia estão livres para rotação. **(c)** Os ácidos graxos completamente saturados na forma estendida empacotam-se em arranjos quase cristalinos, estabilizados por muitas interações hidrofóbicas. **(d)** A presença de um ou mais ácidos graxos com ligações duplas *cis* (em vermelho) interfere nesse agrupamento compacto e resulta em agregados menos estáveis.

pois contém dois ou três ácidos graxos diferentes. Para dar nome a esses compostos sem gerar ambiguidade, o nome e a posição de cada ácido graxo devem ser especificados.

Como as hidroxilas polares do glicerol e os carboxilatos polares dos ácidos graxos estão em ligações éster, os triacilgliceróis são moléculas apolares, hidrofóbicas, essencialmente insolúveis em água. Os lipídeos têm densidades específicas mais baixas do que a água, o que explica por que as misturas de óleo e água (p. ex., tempero de salada com azeite e vinagre) têm duas fases: o óleo, com densidade específica mais baixa, flutua sobre a fase aquosa.

Os triacilgliceróis armazenam energia e proporcionam isolamento térmico

Na maioria das células eucarióticas, os triacilgliceróis formam uma fase separada de gotículas microscópicas de óleo no citosol aquoso, servindo como depósitos de combustível metabólico. Em vertebrados, células especializadas, chamadas de adipócitos (células do tecido adiposo), armazenam grandes quantidades de triacilgliceróis em gotículas de gordura que quase preenchem a célula (**Figura 10-3a**). Os triacilgliceróis também são armazenados como óleos nas sementes de vários tipos de plantas, fornecendo energia e precursores biossintéticos durante a germinação da semente (**Figura 10-3b**). Os adipócitos e as sementes em germinação contêm **lipases**, enzimas que catalisam a hidrólise dos triacilgliceróis armazenados, liberando ácidos graxos para

serem transportados para os locais onde são necessários como combustível.

Existem duas vantagens significativas em se usar triacilgliceróis para o armazenamento de combustível, em vez de polissacarídeos, como o glicogênio e o amido. Primeiro, os átomos de carbono dos ácidos graxos estão mais reduzidos do que os dos açúcares, e a oxidação de um grama de triacilgliceróis libera mais do que o dobro de energia do que a oxidação de um grama de carboidratos. Segundo, como os triacilgliceróis são hidrofóbicos e, portanto, não hidratados, o organismo que carrega gordura como combustível não precisa carregar o peso extra da água da hidratação que está associada aos polissacarídeos armazenados (2 g por grama de polissacarídeo). Os seres humanos apresentam tecido adiposo (composto principalmente por adipócitos) sob a pele, na cavidade abdominal e nas glândulas mamárias. As pessoas moderadamente obesas, com 15 a 20 kg de triacilgliceróis depositados em seus adipócitos, poderiam suprir suas necessidades energéticas por meses utilizando seus depósitos de gordura. Em contrapartida, o corpo humano consegue armazenar na forma de glicogênio menos do que a quantidade de energia utilizada em um dia. Os carboidratos como a glicose, contudo, oferecem certas vantagens como

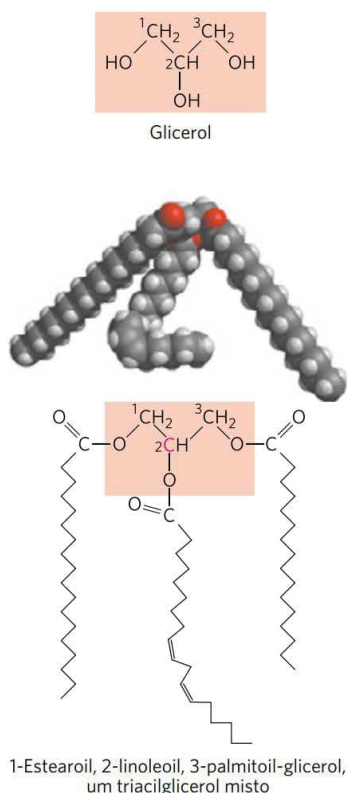


FIGURA 10-2 O glicerol e um triacilglicerol. O triacilglicerol misto mostrado aqui tem três ácidos graxos diferentes ligados à cadeia do glicerol. Quando o glicerol apresenta ácidos graxos diferentes em C-1 e C-3, o C-2 é um centro quiral (p. 17).

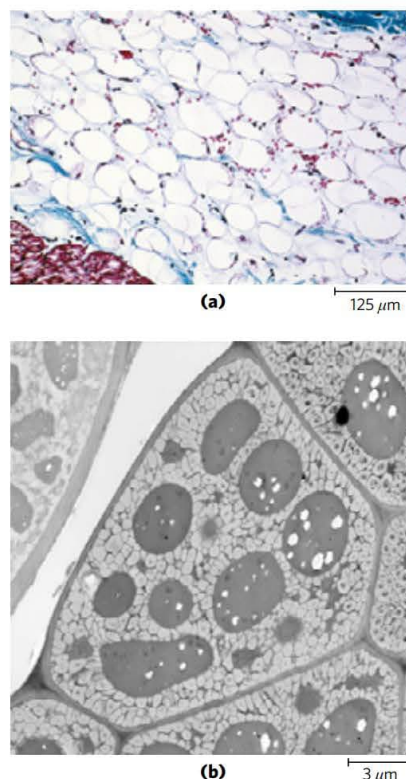


FIGURA 10-3 Depósitos de gordura nas células. (a) Secção transversal de tecido adiposo branco de seres humanos. Cada célula contém uma gotícula de gordura (em branco) tão grande que espreme o núcleo (corado em vermelho) contra a membrana plasmática. (b) Secção transversal de uma célula de cotilédono de uma semente da planta *Arabidopsis*. As estruturas grandes e escuras são corpos proteicos, que estão rodeados por gordura de armazenamento nos corpos oleosos, de coloração clara. (Fontes: (a) Biophoto Associates/Science Source. (b) Cortesia de Howard Goodman, Departamento de Genética, Escola de Medicina de Harvard.)

fontes rápidas de energia metabólica, uma das quais é a sua solubilidade imediata em água.

Em alguns animais, os triacilgliceróis armazenados sob a pele servem tanto de estoques de energia quanto de isolamento contra baixas temperaturas. Focas, morsas, pinguins e outros animais polares de sangue quente apresentam sua superfície amplamente coberta por triacilgliceróis. Em animais hibernantes, como os ursos, as enormes reservas de energia acumuladas antes da hibernação servem para dois propósitos: isolamento térmico e reserva de energia (ver Quadro 17-1).

A hidrogenação parcial de óleos de cozinha melhora sua estabilidade, mas cria ácidos graxos com efeitos danosos para a saúde



A maior parte das gorduras naturais, como aquelas encontradas em óleos vegetais, laticínios e gordura animal, são misturas complexas de triacilgliceróis simples e mistos. Essas gorduras contêm uma variedade de ácidos graxos que diferem no comprimento da cadeia e no grau de saturação (Figura 10-4). Os óleos vegetais, como os óleos de milho e de oliva, são compostos em grande parte por triacilgliceróis com ácidos graxos insaturados e, portanto, são líquidos à temperatura ambiente. Os triacilgliceróis que contêm somente ácidos graxos saturados, como a triestearina, o componente mais importante da gordura da carne bovina, são sólidos brancos e gordurosos em temperatura ambiente.

Quando alimentos ricos em lipídeos são expostos por muito tempo ao oxigênio do ar, eles podem estragar e tornar-se rançosos. O gosto e o cheiro desagradáveis associados à rancificação resultam da clivagem oxidativa das ligações duplas em ácidos graxos insaturados, que produz aldeídos e ácidos carboxílicos de comprimento menor de cadeia e, portanto, de maior volatilidade; esses compostos se dispersam prontamente pelo ar até alcançarem seu nariz. Ao longo do século XX, para aumentar o prazo de validade de óleos vegetais de cozinha e para aumentar a sua estabilidade nas altas temperaturas utilizadas na fritura, os óleos vegetais foram preparados por hidrogenação parcial. Esse processo converte muitas das ligações duplas *cis* dos ácidos graxos em ligações simples e aumenta o ponto de fusão dos óleos, de forma que eles ficam mais próximos do estado sólido em temperatura ambiente (a margarina é produzida assim, a partir de óleo vegetal). A hidrogenação parcial, contudo, tem um efeito indesejado: algumas ligações duplas *cis* são convertidas em ligações duplas *trans*. Hoje existem fortes evidências de que o consumo de dietas contendo ácidos graxos *trans* (frequentemente chamados de “gorduras *trans*”) leva a uma maior incidência de doenças cardiovasculares e que evitar essas gorduras na dieta reduz consideravelmente o risco de doenças cardíacas. Os ácidos graxos *trans* da dieta aumentam o nível de triacilgliceróis e de colesterol LDL (o colesterol “ruim”) no sangue e diminuem o nível de colesterol HDL (o colesterol “bom”). Essas mudanças por si só são suficientes para aumentar o risco de doenças cardíacas, mas os ácidos graxos *trans* podem ter outros efeitos adversos. Eles parecem, por exemplo, aumentar a resposta inflamatória do corpo, o que é outro fator de risco para doenças cardíacas. (Ver no Capítulo 21 uma

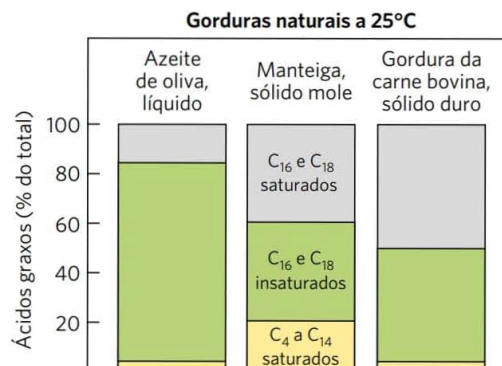


FIGURA 10-4 Composição de ácidos graxos de três gorduras alimentares. Óleo de oliva, manteiga e gordura da carne bovina consistem em misturas de triacilgliceróis, diferindo em sua composição de ácidos graxos. Os pontos de fusão dessas gorduras – e, portanto, o seu estado físico à temperatura ambiente (25°C) – variam de acordo com sua composição de ácidos graxos. O óleo de oliva tem alta proporção de ácidos graxos insaturados de cadeia longa (C_{16} e C_{18}), o que explica seu estado líquido a 25°C. A maior proporção de ácidos graxos saturados de cadeia longa (C_{16} e C_{18}) na manteiga causa um aumento no ponto de fusão, de modo que a manteiga é um sólido macio à temperatura ambiente. A gordura da carne bovina, com uma proporção ainda maior de ácidos graxos saturados de cadeia longa, é um sólido duro.

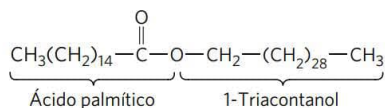
descrição do colesterol LDL e HDL – lipoproteínas de baixa e de alta densidade – e seus efeitos na saúde.) Agências regulatórias em todo o mundo agora limitaram ou baniram o uso de ácidos graxos *trans* na preparação ou no acondicionamento de alimentos. ■

As ceras servem como reservas de energia e como impermeabilizantes à água

As ceras biológicas são ésteres de ácidos graxos saturados e insaturados de cadeia longa (C_{14} a C_{36}) com álcoois de cadeia longa (C_{16} a C_{30}) (Figura 10-5). Seus pontos de fusão (60 a 100°C) são, em geral, mais altos que aqueles dos triacilgliceróis. No plâncton, microrganismos flutuantes na base da cadeia alimentar dos animais marinhos, as ceras são a principal forma de armazenamento de combustível metabólico.

As ceras também servem para uma variedade de outras funções relacionadas às suas propriedades impermeabilizantes e sua consistência firme. Certas glândulas da pele de vertebrados secretam ceras para proteger os pelos e a pele e mantê-los flexíveis, lubrificados e impermeáveis. As aves, particularmente as aquáticas, secretam ceras por suas glândulas uropigiais para manter suas penas impermeáveis à água. As folhas lustrosas do azevinho, do rododendro, da hera venenosa e de muitas outras plantas tropicais são cobertas por uma camada grossa de ceras, que impede a evaporação excessiva de água e as protege contra parasitas.

As ceras biológicas têm várias aplicações em indústrias como a farmacêutica e a cosmética, entre outras. A lanolina (da lã de cordeiro), a cera de abelhas (Figura 10-5), a cera de carnaúba (palmeira brasileira) e a cera extraída das sementes do arbusto jojoba são amplamente utilizadas na manufatura de loções, pomadas e polidores.



(a)



(b)

FIGURA 10-5 Cera biológica. (a) Triacontanoilpalmitato, o principal componente da cera de abelha, é um éster de ácido palmítico com o álcool triacontanol. (b) A cera de um favo de mel é firme a 25°C e completamente impermeável à água. [Fonte: (b) iStockphoto/Thinkstock.]

RESUMO 10.1 Lipídeos de armazenamento

- Os lipídeos são componentes celulares insolúveis em água, de estruturas diversas, que podem ser extraídos dos tecidos por solventes apolares.
- Quase todos os ácidos graxos, os componentes hidrocarbonados de muitos lipídeos, têm um número par de átomos de carbono (geralmente 12 a 24); eles são saturados ou insaturados, com ligações duplas quase sempre na configuração *cis*.

- Os triacilgliceróis contêm três moléculas de ácidos graxos esterificadas aos três grupos hidroxila do glicerol. Os triacilgliceróis simples contêm somente um tipo de ácido graxo; os mistos contêm dois ou três tipos. Eles são principalmente gorduras de reserva, estando presentes em muitos alimentos.
- Uma vez que ácidos graxos *trans* na dieta representam um fator de risco importante para doença cardíaca coronariana, seu uso em alimentos preparados e processados está sendo bastante regulado.
- Ceras são ésteres de ácidos graxos de cadeia longa com álcoois de cadeia longa.

10.2 Lipídeos estruturais em membranas

A característica central na arquitetura das membranas biológicas é uma dupla camada de lipídeos que atua como barreira à passagem de moléculas polares e íons. Os lipídeos de membrana são anfipáticos: uma extremidade da molécula é hidrofóbica e a outra é hidrofílica. Suas interações hidrofóbicas entre si e suas interações hidrofílicas com a água direcionam o seu empacotamento em lâminas, chamadas de bicamadas da membrana. Esta seção descreve cinco tipos gerais de lipídeos de membrana: glicerofosfolipídeos, nos quais as regiões hidrofóbicas são compostas por dois ácidos graxos ligados ao glicerol; galactolipídeos e sulfolipídeos, que também contêm dois ácidos graxos esterificados ao glicerol, mas não apresentam os fosfatos característicos dos fosfolipídeos; lipídeos tetraéter em arqueia, nos quais duas cadeias muito longas de alquilas estão unidas por ligação éter ao glicerol em ambas as extremidades; esfingolipídeos, nos quais um único ácido graxo está ligado a uma amina graxa, a esfingosina; e esteróis, compostos caracterizados por um sistema rígido de quatro anéis hidrocarbonados fusionados.

As porções hidrofílicas nesses compostos anfipáticos podem ser tão simples quanto um único grupo —OH em

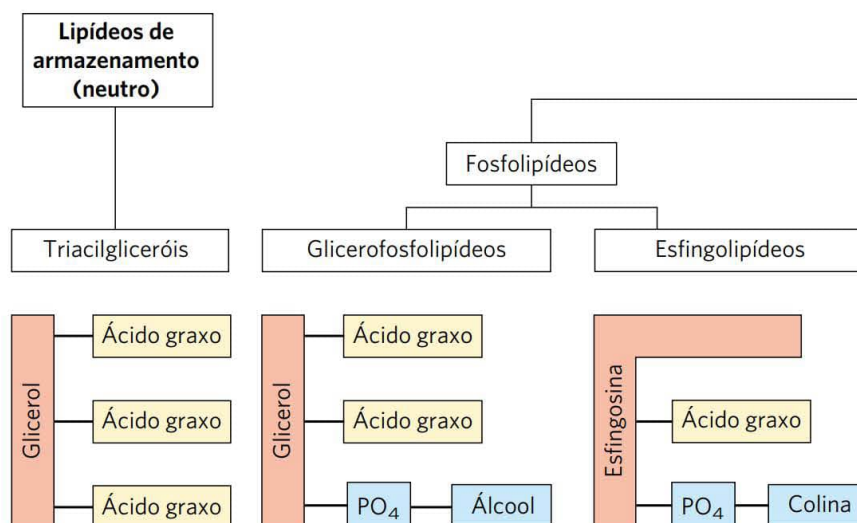
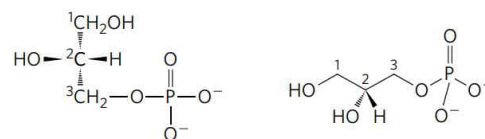


FIGURA 10-6 Alguns tipos comuns de lipídeos de armazenamento e de membrana. Todos os tipos de lipídeos apresentados aqui têm ou glicerol ou esfingosina como esqueleto (em cor salmão), ao qual estão ligados um ou mais grupos alquila de cadeia longa (em amarelo) e uma cabeça polar (em azul). Em triacilgliceróis, glicerofosfolipídeos, galactolipídeos e sulfolipídeos, os grupos alquilas são ácidos graxos em ligação éster. Os esfingolipídeos contêm um único ácido graxo em ligação amida com o esqueleto de esfingosina. Os lipídeos de membrana de arqueias são variáveis; aqueles

uma extremidade do sistema de anéis do esteroide, ou podem ser bem mais complexas. Nos glicerofosfolípídeos e alguns esfingolípídeos, a cabeça polar está unida à porção hidrofóbica por uma ligação fosfodiéster; estes são os **fosfolípídeos**. Outros esfingolípídeos não apresentam fosfato, mas têm um açúcar simples ou um oligossacarídeo complexo em suas extremidades polares; estes são os **glicolípídeos** (**Figura 10-6**). Nesses grupos de lipídeos de membrana, uma enorme diversidade resulta de várias combinações de “caudas” de ácidos graxos e “cabeças” polares. O arranjo desses lipídeos nas membranas e seus papéis estruturais e funcionais são considerados no próximo capítulo.

Os glicerofosfolípídeos são derivados do ácido fosfatídico

Os **glicerofosfolípídeos**, também chamados de fosfoglicerídeos, são lipídeos de membrana nos quais dois ácidos graxos estão unidos por ligação éster ao primeiro e ao segundo carbono do glicerol e um grupo fortemente polar ou carregado está unido por ligação fosfodiéster ao terceiro carbono. O glicerol é pró-quiral: não apresenta carbonos assimétricos, mas a ligação de um fosfato a uma extremidade o converte em um composto quiral, que pode ser chamado corretamente de L-glicerol-3-fosfato, D-glicerol-1-fosfato ou *sn*-glicerol-3-fosfato (**Figura 10-7**). Os glicerofosfolípídeos são denominados como derivados do composto precursor, o ácido fosfatídico (**Figura 10-8**), de acordo com o álcool polar que forma a cabeça polar. A fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina têm colina e etanolamina como cabeças polares, por exemplo. A cardiolipina é um glicerofosfolípídeo no qual duas moléculas de ácido fosfatídico estão ligadas ao mesmo glicerol, que funciona como a cabeça polar (**Figura 10-8**). A cardiolipina é encontrada na maioria das membranas bacterianas; nas células eucarióticas, a cardiolipina está localizada quase exclusivamente na membrana mitocondrial interna (onde é sintetizada), uma hipótese consistente com a hipótese endossimbiótica da origem dessas organelas (ver **Figura 1-40**).

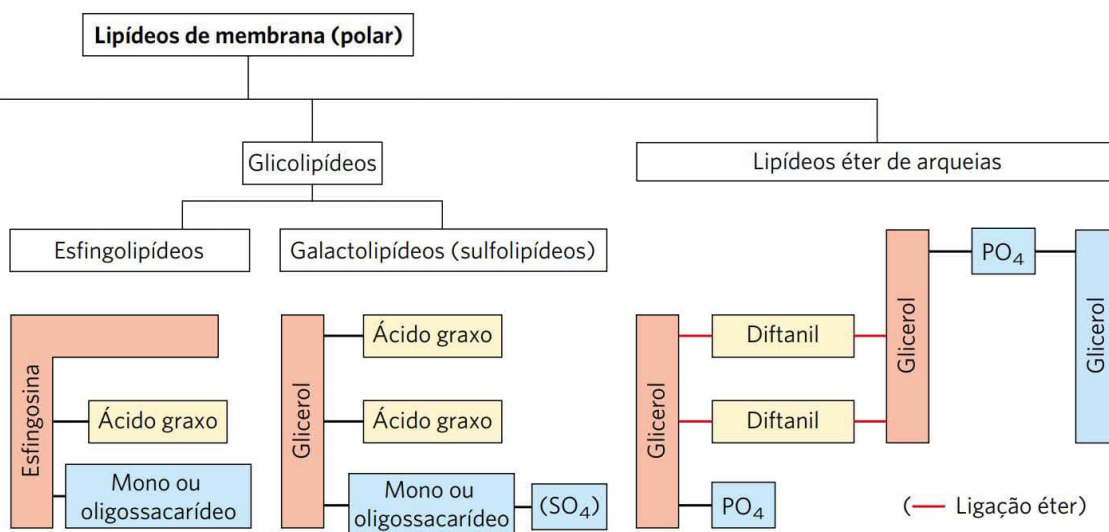


L-Glicerol-3-fosfato (*sn*-glicerol-3-fosfato)

FIGURA 10-7 L-Glicerol-3-fosfato, o esqueleto dos fosfolípídeos. O glicerol por si só não é quiral, visto que ele tem um plano de simetria através de C-2. O glicerol, contudo, é pró-quiral – pode ser convertido em um composto quiral pela adição de um substituinte como o fosfato a qualquer dos grupos $\text{—CH}_2\text{OH}$. Uma nomenclatura não ambígua para o glicerol fosfato é o sistema D, L (descrito na p. 78), no qual os isômeros são denominados de acordo com suas relações estereoquímicas com os isômeros do gliceraldeído. Por este sistema, o estereoisômero do glicerol-fosfato encontrado na maioria dos lipídeos é corretamente denominado L-glicerol-3-fosfato ou D-glicerol-1-fosfato. Outra forma para especificar estereoisômeros é o sistema *sn* (numeração estereoespecífica), no qual C-1 é, por definição, o grupo do composto pró-quiral que ocupa a posição pró-S. A forma comum de glicerol-fosfato em fosfolípídeos é, por esse sistema, *sn*-glicerol-3-fosfato (na qual C-2 está na configuração R). Em arqueias, o glicerol nos lipídeos está na outra configuração; ou seja, D-glicerol-3-fosfato.

Em todos esses compostos, o grupo que forma a cabeça polar está unido ao glicerol por uma ligação fosfodiéster, na qual o grupo fosfato tem carga negativa em pH neutro. O álcool polar pode estar carregado negativamente (assim como no fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato), neutro (fosfatidilserina) ou carregado positivamente (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina). Como será visto no Capítulo 11, essas cargas contribuem de modo significativo para as propriedades de superfície das membranas.

Como os ácidos graxos nos glicerofosfolípídeos podem ser qualquer um de uma ampla variedade, um dado fosfolípídeo (p.ex., fosfatidilcolina) pode consistir em várias espécies moleculares, cada qual com seu conjunto único de ácidos graxos. A distribuição de espécies moleculares é específica



representados aqui têm duas cadeias alquila muito longas e ramificadas, cada extremidade em ligação éter com a porção glicerol. Nos fosfolípídeos, a cabeça polar está unida por meio de ligação fosfodiéster, ao passo que os glicolípídeos têm uma ligação glicosídica direta entre o açúcar da cabeça polar e o esqueleto de glicerol.

<div> <div> <div>Ácido graxo saturado (p. ex., ácido palmítico)</div> <div>Ácido graxo insaturado (p. ex., ácido oleico)</div> </div> <div> </div> </div>			
Nome do glicerofosfolípideo	Cabeça polar	Fórmula do grupo X	Carga líquida (em pH 7)
Ácido fosfatídico	—	—H	-2^*
Fosfatidiletanolamina	Etanolamina		0
Fosfatidilcolina	Colina		0
Fosfatidilserina	Serina		-1
Fosfatidilglicerol	Glicerol		-1
Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato	Mio-inositol-4,5-bisfosfato		-4^*
Cardiolipina	Fosfatidiglicerol		-2

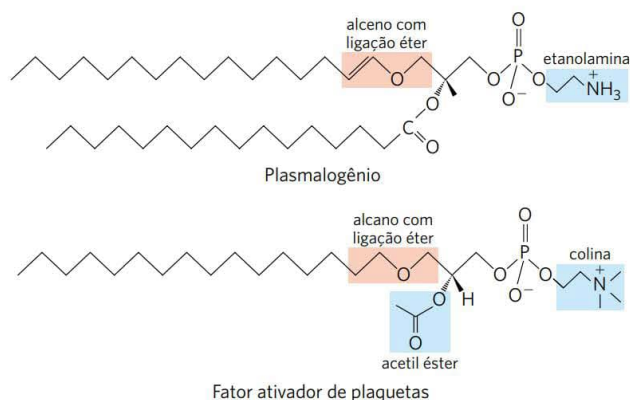
FIGURA 10-8 Glicerofosfolípeidos. Os glicerofosfolípeidos comuns são diacilgliceróis ligados a grupos álcool por ligação fosfodiéster. O ácido fosfatídico, um fosfomonoéster, é o composto precursor. Cada derivado é denominado de acordo com o grupo álcool que forma a cabeça polar, com o prefixo “fosfatidil-”. Na cardiolipina, dois ácidos fosfatídicos compartilham um único glicerol (R^1 e R^2 são grupos acila graxos). *Observe que cada um dos ésteres de fosfato tem uma carga de cerca de $-1,5$; um de seus grupos —OH está apenas parcialmente ionizado em pH 7,0.

para diferentes organismos, diferentes tecidos do mesmo organismo e diferentes glicerofosfolípeidos na mesma célula ou tecido. Em geral, os glicerofosfolípeidos contêm um ácido graxo saturado C_{16} ou C_{18} em C-1 e um ácido graxo insaturado C_{18} ou C_{20} em C-2. Com poucas exceções, o significado biológico da variação dos ácidos graxos e dos grupos que formam a cabeça polar ainda não é entendido.

Alguns glicerofosfolípeidos têm ácidos graxos em ligação éter

Alguns tecidos animais e organismos unicelulares são ricos em **lipídeos éter**, nos quais uma das duas cadeias de acila

está unida ao glicerol em ligação éter, em vez de éster. A cadeia com ligação éter pode ser saturada, como nos lipídeos éter de alquila, ou pode conter uma ligação dupla entre C-1 e C-2, como nos **plasmalogênios (Figura 10-9)**. O tecido cardíaco de vertebrados é especialmente rico em lipídeos éter; cerca de metade dos fosfolípeidos do coração é plasmalogênio. As membranas de bactérias halofílicas, protistas ciliados, e de certos invertebrados também contêm altas proporções de lipídeos éter. O significado funcional dos lipídeos éter nessas membranas é desconhecido; talvez sua resistência às fosfolipases que clivam ácidos graxos com ligação éster de lipídeos de membrana seja importante em alguns casos.



Ao menos um lipídeo éter, o **fator ativador de plaquetas**, é um potente sinalizador molecular. Ele é liberado de leucócitos chamados de basófilos e estimula a agregação de plaquetas e a liberação de serotonina (um vasoconstritor) das plaquetas. Também exerce vários efeitos no fígado, no músculo liso, no coração, nos tecidos uterinos e pulmonares, desempenhando também um importante papel na inflamação e na resposta alérgica. ■

Os cloroplastos contêm galactolipídeos e sulfolipídeos

O segundo grupo de lipídeos de membrana é aquele que predomina nas células vegetais: os **galactolipídeos**, nos quais um ou dois resíduos de galactose estão conectados por uma ligação glicosídica ao C-3 de um 1,2-diacilglicerol (Figura 10-10; ver também Figura 10-6). Os galactolipídeos estão localizados nas membranas dos tilacoides (membranas internas) dos cloroplastos; eles compõem de 70 a 80% do total dos lipídeos de membrana de uma planta vascular e são, provavelmente, os lipídeos de membrana mais abundantes na biosfera. O fosfato frequentemente é o nutriente limitante das plantas no solo; talvez a pressão evolutiva para conservar fosfato para papéis mais críticos tenha favorecido as plantas que produzem lipídeos sem fosfato. As membranas das plantas também contêm sulfolipídeos, nos quais um resíduo de glicose sulfonado está unido a um diacilglicerol em

FIGURA 10-9 Lipídeos éter. Os plasmalogenos têm uma cadeia alquênica em ligação éter, ao passo que a maioria dos glicerofosfolípidos tem um ácido graxo em ligação éster (comparar com a Figura 10-8). O fator ativador de plaquetas tem uma longa cadeia de alquila em ligação éter no C-1 do glicerol, porém C-2 está em ligação éster com ácido acético, o que torna o composto muito mais hidrossolúvel que a maioria dos glicerofosfolípidos e plasmalogenos. O grupo álcool formando a cabeça polar é a etanolamina nos plasmalogenos e a colina no fator ativador de plaquetas.

ligação glicosídica. O grupo sulfonato apresenta uma carga negativa como aquela do grupo fosfato em fosfolípidos.

Arqueias contêm lipídeos de membrana únicos

Algumas arqueias que vivem em nichos ecológicos com condições extremas – altas temperaturas (água fervente), pH baixo, força iônica alta, por exemplo – têm lipídeos de membrana contendo compostos hidrocarbonados de cadeia longa (32 carbonos) ramificados, unidos em ambas as extremidades a um glicerol (Figura 10-11). Essas ligações ocorrem via ligações éter, muito mais estáveis à hidrólise em pH baixo e altas temperaturas que as ligações éster nos lipídeos de bactérias e eucariotos. Em sua fórmula completamente estendida, esses lipídeos de arqueias apresentam o dobro do comprimento dos fosfolípidos e esfingolipídeos e podem atravessar a largura total da membrana plasmática. Em cada extremidade da molécula estendida há um grupo polar que consiste em glicerol ligado a fosfato ou a resíduos de açúcar. O nome geral desses compostos, tetraéteres de glicerol-dialquil-glicerol (GDGT), reflete sua estrutura única. A porção glicerol dos lipídeos das arqueias não é o mesmo estereoisômero dos lipídeos de bactérias e de eucariotos; o carbono central está na configuração R em arqueias e na configuração S em bactérias e eucariotos (Figura 10-7).

Os esfingolipídeos são derivados da esfingosina

Os **esfingolipídeos**, a quarta grande classe de lipídeos de membrana, também têm uma cabeça polar e duas caudas apolares; contudo, ao contrário dos glicerofosfolípidos e galactolipídeos, eles não contêm glicerol. Os esfingolipídeos

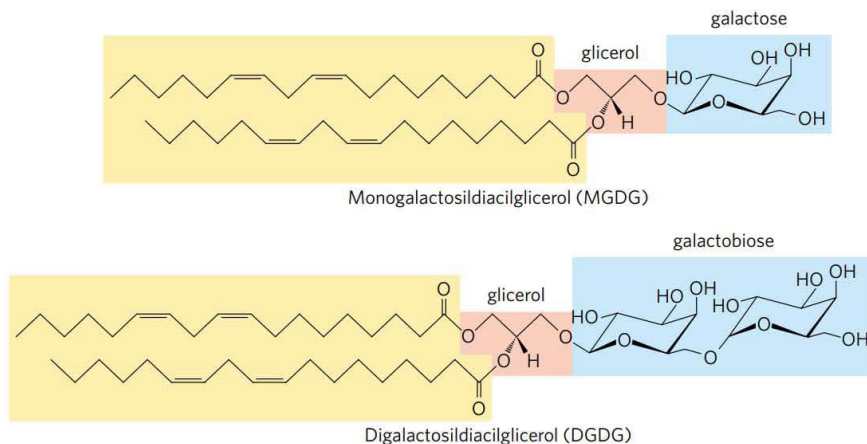


FIGURA 10-10 Dois galactolipídeos de membrana dos tilacoides de cloroplastos. Nos monogalactosyldiacylgliceróis (MGDG) e digalactosyldiacylgliceróis (DGDG), ambos os grupos acila estão poli-insaturados e as cabeças polares não têm carga elétrica.

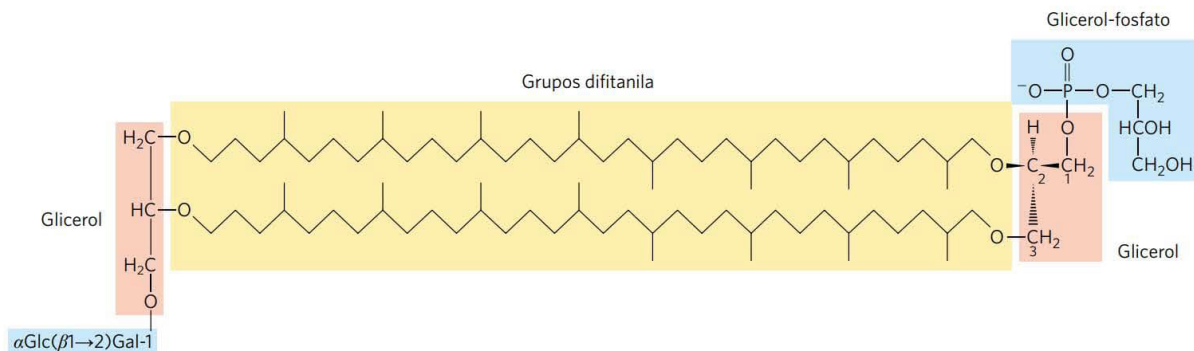


FIGURA 10-11 Um lipídeo de membrana atípico, encontrado apenas em algumas arqueias. Neste tetraéter lipídico de difitanila, as porções difitanílicas (em amarelo) são longas cadeias hidrocarbonadas, compostas por oito grupos isopreno de cinco carbonos condensados cabeça a cabeça. (Para a condensação das unidades de isopreno, ver Figura 21-36; comparar os grupos difitanílicos com a cadeia lateral fitol, de 20 carbonos, da clorofila, na Figura 20-8a.) Nesta forma estendida, os grupos difitanílicos são aproximadamente duas vezes maiores do que o comprimento de um ácido graxo de 16 carbonos geralmente encontrado nos lipídeos de membrana das bactérias e dos eucariotos. O glicerol ligado nos lipídeos de arqueias está na configuração R, ao contrário daquele das bactérias e dos eucariotos, que têm configuração S. Os lipídeos de arqueias diferem nos substituintes dos gliceróis. Na molécula aqui representada, um glicerol está ligado ao dissacarídeo α -glicopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -galactofuranose; o outro glicerol está ligado a um grupo glicerol-fosfato.

são compostos por uma molécula de aminoálcool, esfingosina, de cadeia longa (também chamada de 4-esfingenina) ou um de seus derivados, uma molécula de um ácido graxo de cadeia longa e um grupo polar unido por uma ligação glicosídica, em alguns casos, e uma ligação fosfodiéster em outros (**Figura 10-12**).

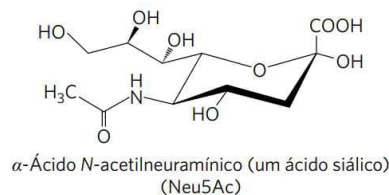
Os carbonos C-1, C-2 e C-3 da molécula de esfingosina são estruturalmente análogos aos três carbonos do glicerol nos glicerofosfolipídeos. Quando um ácido graxo é unido em ligação amida ao —NH_2 no C-2, o composto resultante é uma **ceramida**, estruturalmente semelhante ao diacilglicerol. Cera-
midas são precursores estruturais de todos os esfingolipídeos.

Há três subclasses de esfingolipídeos, todos derivados de ceramidas, mas diferindo em suas cabeças polares: esfingomielinas, glicolipídeos neutros (não carregados) e gangliosídeos. As **esfingomielinas** contêm fosfocolina ou fosfoetanolamina como grupo polar, sendo assim classificadas junto com os glicerofosfolipídeos como fosfolipídeos (Figura 10-6). De fato, as esfingomielinas se parecem com as fosfatidilcolinas em suas propriedades gerais e na estrutura tridimensional e por não terem carga líquida em suas cabeças polares (**Figura 10-13**). As esfingomielinas, presentes nas membranas plasmáticas das células animais, são especialmente proeminentes na mielina, bainha membranosa que envolve e isola os axônios de alguns neurônios – daí o nome “esfingomielinas”.

Os **glicoesfingolipídeos**, que ocorrem amplamente na face externa das membranas plasmáticas, possuem cabeças polares com um ou mais açúcares conectados diretamente ao —OH no C-1 da porção ceramida; eles não contêm fosfato. Os **cerebrosídeos** têm um único açúcar ligado à ceramida; os que têm galactose são caracteristicamente encontrados nas membranas plasmáticas das células em tecido neural, e os que têm glicose nas membranas plasmáticas das células, em tecidos não neurais. Os **globosídeos** são glicoesfingolipídeos com dois ou mais açúcares, geralmente D-glicose, D-galactose, ou N-acetil-D-galactosamina. Cerebrosídeos e globosídeos são às vezes chamados de **glicolipídeos neutros**, pois não têm carga em pH 7.

Os **gangliosídeos**, os esfingolipídeos mais complexos, têm oligossacarídeos formando a cabeça polar e um ou mais

resíduos do ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac), um ácido siálico (frequentemente chamado apenas de “ácido siálico”), nas terminações. O ácido siálico desprotonado confere aos gangliosídeos carga negativa em pH 7 que os distingue dos globosídeos. Os gangliosídeos com um resíduo de ácido siálico estão na série GM (*M* de mono-), os com dois resíduos estão na série GD (*D* de di-) e assim por diante (GT, três resíduos de ácido siálico; GQ, quatro).



Os esfingolipídeos nas superfícies celulares são sítios de reconhecimento biológico

Quando os esfingolipídeos foram descobertos há mais de um século pelo médico e químico Johann Thudichum, o seu papel biológico parecia tão enigmático quanto a Esfinge, e ele os batizou em homenagem a esse monumento. Em seres humanos, pelo menos 60 esfingolipídeos diferentes foram identificados nas membranas celulares. Muitos são especialmente proeminentes na membrana plasmática dos neurônios e alguns são claramente sítios de reconhecimento na superfície celular, porém a função específica já foi descoberta para apenas alguns esfingolipídeos. As porções de carboidrato de certos esfingolipídeos definem os grupos sanguíneos humanos e, portanto, definem o tipo de sangue que os indivíduos podem receber com segurança nas transfusões sanguíneas (**Figura 10-14**).



Os gangliosídeos estão concentrados na superfície externa das membranas plasmáticas das células, onde apresentam pontos de reconhecimento para moléculas extracelulares ou superfícies de células vizinhas. Os tipos e as quantidades de gangliosídeos na membrana plasmática mudam consideravelmente durante o desenvol-



Johann Thudichum, 1829-1901
[Fonte: J. L. W. Thudichum,
Tubingen, F. Pietzcker (1898).]

Esfingosina		
Ácido graxo		Cabeça polar substituinte
Nome do esfingolípido	Cabeça polar	Fórmula de —X
Ceramida	—	—H
Esfingomielina	Fosfocolina	
Glicolípídeos neutros Glicosilcerebrosídeo	Glicose	
Lactosilceramida (globosídeo)	Di, tri ou tetrassacarídeo	
Gangliosídeo GM2	Oligossacarídeo complexo	

FIGURA 10-12 Esfingolípídeos. Os três primeiros carbonos na extremidade polar da esfingosina são análogos aos três carbonos do glicerol nos glicerofosfolípídeos. O grupo amina em C-2 está ligado a um ácido graxo em ligação amida. O ácido graxo geralmente é saturado ou monoinsaturado, com 16, 18, 22 ou 24 átomos de carbono. A ceramida é o composto precursor para esse grupo. Os outros esfingolípídeos diferem no grupo que constitui a cabeça polar, ligado em C-1. Os gangliosídeos têm grupos de oligossacarídeos muito complexos. Os símbolos padrão para os açúcares são usados nesta figura, como mostrado na Tabela 7-1.

vimento embrionário. A formação de tumores induz a síntese de um novo conjunto de gangliosídeos, e descobriu-se que concentrações muito baixas de um gangliosídeo específico induzem a diferenciação de células tumorais neurais em cultura. A síndrome de Guillain-Barré é uma doença autoimune grave, na qual o organismo produz anticorpos contra seus próprios gangliosídeos, incluindo aqueles nos neurônios. A inflamação resultante causa lesões no

sistema nervoso periférico, levando à paralisia temporária (ou, algumas vezes, permanente). A toxina do cólera, produzida pela bactéria intestinal *Vibrio cholerae*, penetra em células sensíveis após ligar-se a gangliosídeos específicos na superfície das células epiteliais do intestino (ver Quadro 12-1). A investigação dos papéis biológicos de diversos gangliosídeos continua sendo uma área em desenvolvimento para pesquisas futuras. ■

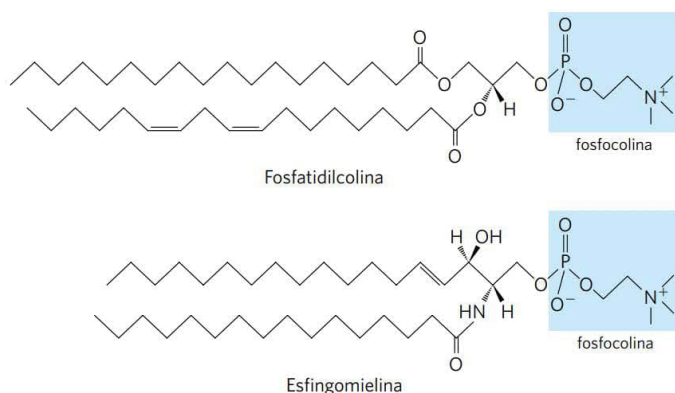


FIGURA 10-13 As estruturas moleculares semelhantes de duas classes de lípídeos de membrana. A fosfatidilcolina (um glicerofosfolípídeo) e a esfingomielina (um esfingolípídeo) possuem dimensões e propriedades físicas semelhantes, mas, presumivelmente, exercem papéis diferentes nas membranas.

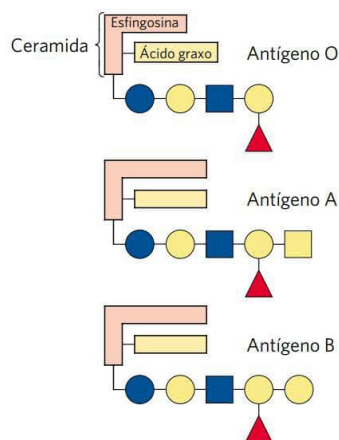


FIGURA 10-14 Glicosíngolipídeos como determinantes dos grupos sanguíneos. Os grupos sanguíneos humanos (O, A, B) são determinados em parte pelos grupos de oligossacarídeos da cabeça desses glicosíngolipídeos. Os mesmos três oligossacarídeos também são encontrados ligados a certas proteínas do sangue de indivíduos dos tipos sanguíneos O, A e B, respectivamente. Os símbolos-padrão para açúcares são utilizados aqui (ver Tabela 7-1).

Os grupos sanguíneos humanos (O, A, B) são determinados em parte pelos grupos de oligossacarídeos da cabeça desses glicosíngolipídeos. Os mesmos três oligossacarídeos também são encontrados ligados a certas proteínas do sangue de indivíduos dos tipos sanguíneos O, A e B, respectivamente. Os símbolos-padrão para açúcares são utilizados aqui (ver Tabela 7-1).

Os fosfolipídeos e os esfingolipídeos são degradados nos lisossomos

A maioria das células degrada e repõe seus lipídeos de membrana. Para cada ligação hidrolisável em um glicerofosfolipídeo, há uma enzima hidrolítica específica no lisossomo (**Figura 10-15**). As fosfolipases do tipo A removem um dos dois ácidos graxos, produzindo um lisofosfolipídeo. (Essas esterases não atacam a ligação éter dos plasmalogênios.) As lisofosfolipases removem o ácido graxo restante.

Os gangliosídeos são degradados por um conjunto de enzimas lisossômicas que catalisam a remoção gradual das unidades de açúcar, produzindo finalmente uma ceramida. Um defeito genético em qualquer uma dessas enzimas hidrolíticas leva ao acúmulo de gangliosídeos na célula, com graves consequências médicas (Quadro 10-1).

Os esteróis têm quatro anéis de carbono fusionados

Os **esteróis** são lipídeos estruturais presentes nas membranas da maioria das células eucarióticas. A estrutura característica desse quinto grupo de lipídeos de membrana é o núcleo esteroide, que consiste em quatro anéis fusionados, três deles com seis carbonos e um com cinco (**Figura 10-16**). O núcleo esteroide é quase planar e é relativamente rígido; os anéis fusionados não permitem rotação em torno das ligações C-C. O **colesterol**, o principal esteroide nos tecidos animais, é anfipático, com uma cabeça polar (o grupo hidroxila em C-3) e um “corpo” hidrocarbonado apolar (o núcleo esteroide e a cadeia lateral hidrocarbonada no C-17), tão longo quanto um ácido graxo de 16 carbonos em sua forma estendida. Esteróis semelhantes são encontrados em outros eucariotos: estigmasterol em plantas e ergosterol em fungos, por exemplo. As bactérias não conseguem sintetizar esteróis; algumas poucas espécies de bactérias, no entanto, podem incorporar esteróis exógenos em suas membranas. Os esteróis de todos os eucariotos são sintetizados a partir de subunidades de isopreno simples de cinco carbonos, assim como as vitaminas lipossolúveis, as quinonas e os dolícolis descritos na Seção 10.3.

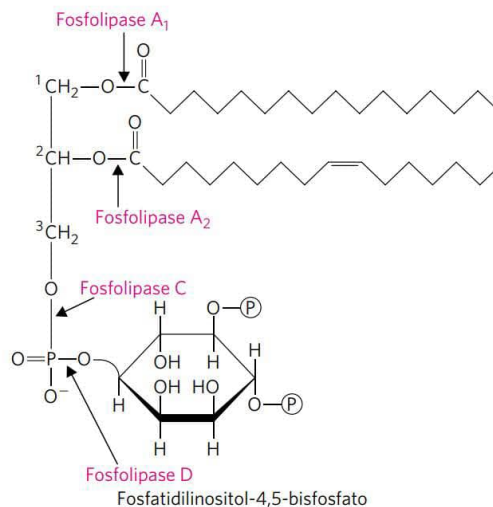


FIGURA 10-15 As especificidades das fosfolipases. As fosfolipases A₁ e A₂ hidrolisam as ligações éster de glicerofosfolipídeos intactos nos carbonos C-1 e C-2 do glicerol, respectivamente. Quando um dos ácidos graxos é removido por uma fosfolipase do tipo A, o segundo ácido graxo é removido por uma lisofosfolipase (não mostrada). Cada uma das fosfolipases C e D rompe uma das ligações fosfodiéster no grupo da cabeça polar. Algumas fosfolipases atuam em somente um tipo de glicerofosfolipídeo, como o fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂, mostrado aqui) ou a fosfatidilcolina; outras são menos específicas.

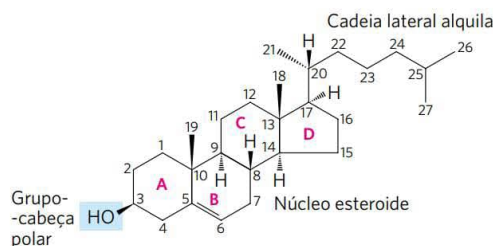
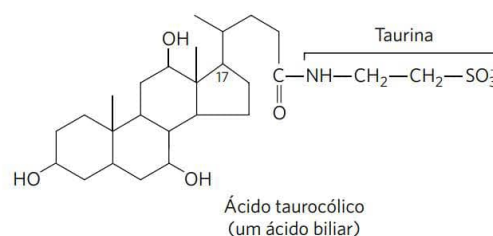


FIGURA 10-16 Colesterol. Na estrutura química do colesterol, os anéis são denominados de A a D para simplificar a referência aos derivados do núcleo esteroide. O grupo hidroxila do C-3 (sombreado em azul) constitui a cabeça polar. Para armazenar e transportar o esteroide, esse grupo hidroxila se condensa com um ácido graxo para formar um éster de esteroide.

Além de seus papéis como constituintes de membrana, os esteróis servem como precursores para uma diversidade de produtos com atividades biológicas específicas. Os hormônios esteróides, por exemplo, são sinalizadores biológicos potentes que regulam a expressão gênica. Os **ácidos biliares** são derivados polares do colesterol que atuam como detergentes no intestino, emulsificando as gorduras da dieta para torná-las mais acessíveis às lipases digestivas.



QUADRO 10-1



MEDICINA

Acúmulos anormais de lipídeos de membrana: algumas doenças humanas herdadas

Os lipídeos anfipáticos das membranas sofrem constante renovação metabólica (*turnover*), e a sua taxa de síntese normalmente é contrabalançada por sua taxa de degradação. A degradação dos lipídeos é promovida por enzimas hidrolíticas nos lisossomos, sendo cada enzima capaz de hidrolisar uma ligação específica. Quando a degradação de esfingolipídeos é prejudicada por um defeito em uma dessas enzimas (Figura Q-1), os produtos da degradação parcial acumulam-se nos tecidos, causando doenças graves. Mais de 50 doenças distintas de armazenamento lisossômico foram descobertas, cada uma delas resultante de uma única mutação em um dos genes de uma proteína lisossômica.

A doença de Niemann-Pick, por exemplo, é causada por um defeito genético raro na enzima esfingomielinase, que cliva a fosfocolina da esfingomielina. A esfingomielina acumula-se no encéfalo, no baço e no fígado.

A doença torna-se evidente em bebês e causa deficiência intelectual e morte prematura. Mais comum é a doença de Tay-Sachs, na qual o gangliosídeo GM2 se acumula no encéfalo e no baço (Figura Q-2) devido à falta da enzima hexosaminidase A. Os sintomas da doença de Tay-Sachs são retardo progressivo no desenvolvimento, paralisia, cegueira e morte até os 3 ou 4 anos de idade.

O aconselhamento genético pode prever e evitar muitas doenças hereditárias. Os testes nos futuros pais podem detectar enzimas anormais, então testes de DNA podem determinar a natureza exata do defeito e o risco que ele representa para os descendentes. Uma vez que ocorra gravidez, as células fetais obtidas por amostra de parte da placenta (da vilosidade coriônica) ou do líquido amniótico (amniocentese) podem ser testadas.

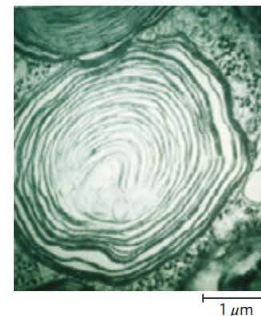
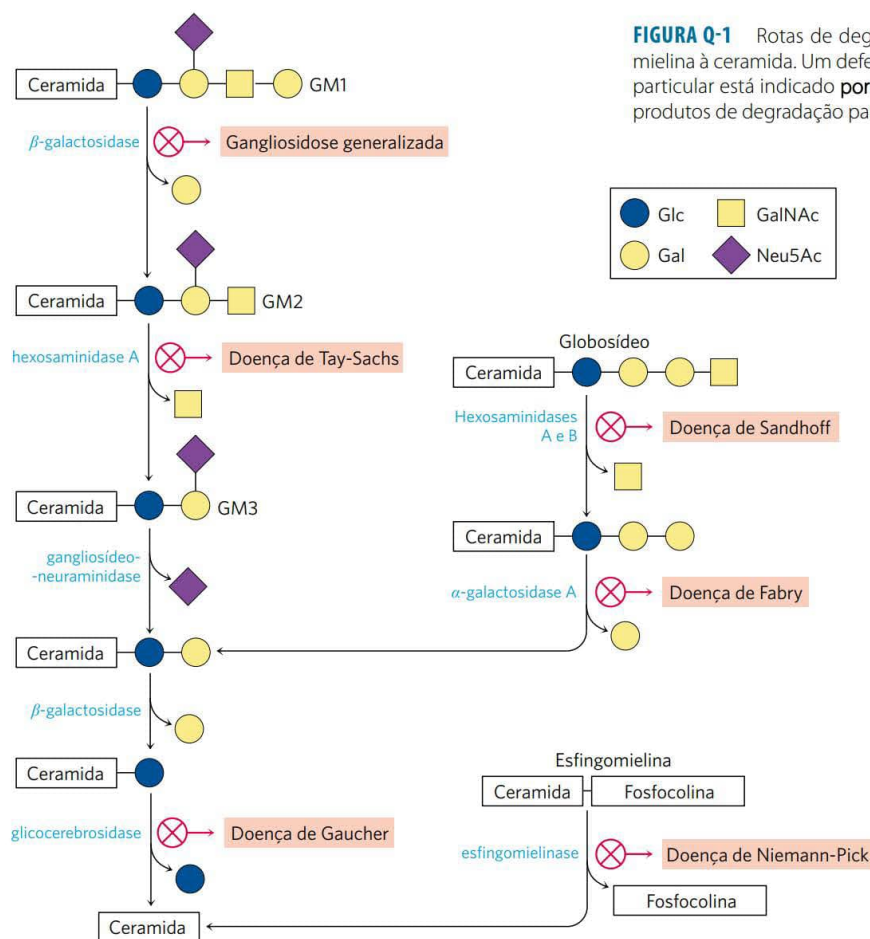


FIGURA Q-2 Eletromicrografia de uma porção de uma célula do encéfalo de um bebê com a doença de Tay-Sachs, obtida *post mortem*, mostrando depósitos anormais de gangliosídeo nos lisossomos. [Fonte: Otis Imboden/National Geographic/Getty Images.]

O colesterol e outros esteróis voltarão a ser abordados em capítulos posteriores, para considerar o papel estrutural do colesterol em membranas biológicas (Capítulo 11), a

sinalização por hormônios esteróides (Capítulo 12) e a rota notável da biossíntese do colesterol e o transporte do colesterol por lipoproteínas carreadoras (Capítulo 21).

RESUMO 10.2 Lipídeos estruturais em membranas

- Os lipídeos anfipáticos, com cabeças polares e caudas apolares, são importantes componentes das membranas. Os mais abundantes são os glicerofosfolipídeos, que contêm ácidos graxos esterificados a dois dos grupos hidroxila do glicerol e um segundo álcool, que constitui a cabeça polar, esterificado à terceira hidroxila do glicerol via uma ligação fosfodiéster. Outros lipídeos com porções polares são os esteróis.
- Os glicerofosfolipídeos diferem na estrutura da cabeça polar; glicerofosfolipídeos comuns são a fosfatidiletanolamina e a fosfatidilcolina. Os grupos polares dos glicerofosfolipídeos estão carregados em pH próximo de 7.
- As membranas dos cloroplastos são ricas em galactolipídeos, compostos de diacilglicerol com um ou dois resíduos de galactose ligados, e sulfolipídeos, diacilgliceróis com um resíduo de açúcar sulfonado ligado, tendo, portanto, uma cabeça polar carregada negativamente.
- Algumas arqueias têm lipídeos de membrana únicos, com grupos alquila de cadeia longa em ligação éter ao glicerol em ambas as extremidades e com resíduos de açúcar e/ou fosfato ligados ao glicerol para fornecer uma cabeça polar ou com carga elétrica. Esses lipídeos são estáveis nas condições extremas nas quais essas arqueias vivem.
- Os esfingolipídeos contêm esfingosina, um aminoálcool alifático de cadeia longa, mas não contêm glicerol. A esfingomielina tem, além de ácido fosfórico e colina, duas longas cadeias hidrocarbonadas, uma que provém de um ácido graxo e outra que provém da esfingosina. Três outras classes de esfingolipídeos são os cerebrosídeos, os globosídeos e os gangliosídeos, que contêm açúcares como componentes.
- Os esteróis têm quatro anéis fusionados e um grupo hidroxila. O colesterol, o principal esteroide em animais, é tanto um componente estrutural das membranas quanto um precursor para uma ampla variedade de esteroides.

10.3 Lipídeos como sinalizadores, cofatores e pigmentos

As duas classes funcionais de lipídeos consideradas até agora (lipídeos de armazenamento e lipídeos estruturais) são importantes componentes celulares; os lipídeos de membrana compõem de 5 a 10% da massa seca da maioria das células, e os lipídeos de armazenamento, mais de 80% da massa de um adipócito. Com algumas exceções importantes, esses lipídeos desempenham um papel *passivo* na célula; os combustíveis lipídicos são armazenados até serem oxidados por enzimas e os lipídeos de membrana formam barreiras impermeáveis em volta das células e dos compartimentos celulares. Outro grupo de lipídeos, presente em quantidades bem menores, tem papéis *ativos* no tráfego metabólico como metabólitos e mensageiros. Alguns servem como sinalizadores potentes – como hormônios, carregados no sangue de um tecido a outro, ou como mensageiros intracelulares gerados em resposta a uma sinalização extracelular (hormônio ou fator de crescimento). Outros funcionam como cofatores enzimáticos em reações de transferência de elé-

trons nos cloroplastos e nas mitocôndrias, ou na transferência de porções de açúcar em várias reações de glicosilação. Um terceiro grupo consiste em lipídeos com um sistema de ligações duplas conjugadas: moléculas de pigmento que absorvem a luz visível. Alguns deles atuam como pigmentos fotossensíveis na visão e na fotossíntese; outros produzem colorações naturais, como o alaranjado das abóboras e cenouras e o amarelo das penas dos canários. Finalmente, um grupo muito grande de lipídeos voláteis produzidos nas plantas serve de sinalizador que é transportado pelo ar, permitindo às plantas comunicarem-se umas com as outras, atraírem animais amigos e dissuadirem inimigos. Esta seção descreve alguns representantes desses lipídeos biologicamente ativos. Em capítulos posteriores, sua síntese e seus papéis biológicos serão considerados em mais detalhes.

Fosfatidilinositol e derivados da esfingosina atuam como sinalizadores intracelulares

O fosfatidilinositol e seus derivados fosforilados atuam em vários níveis para regular a estrutura celular e o metabolismo. O fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂; Figura 10-15) na face citoplasmática (interna) da membrana plasmática serve como um reservatório de moléculas mensageiras que são liberadas dentro da célula em resposta a sinais extracelulares interagindo com receptores de superfície específicos. Sinais extracelulares, como o hormônio vasopressina, ativam uma fosfolipase C específica na membrana, a qual hidrolisa o fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato, liberando dois produtos que atuam como mensageiros intracelulares: o inositol-1,4,5-trisfosfato (IP₃), que é solúvel em água, e o diacilglicerol, que permanece associado à membrana plasmática. O IP₃ provoca a liberação de Ca²⁺ do retículo endoplasmático, e a combinação do diacilglicerol e da elevada concentração citosólica de Ca²⁺ ativa a enzima proteína-cinase C. Pela fosforilação de proteínas específicas, essa enzima ativa a resposta celular ao sinal extracelular. Esse mecanismo de sinalização é descrito mais detalhadamente no Capítulo 12 (ver Figura 12-11).

Fosfolipídeos de inositol também servem como pontos de nucleação para complexos supramoleculares envolvidos na sinalização ou na exocitose. Certas proteínas sinalizadoras ligam-se especificamente ao fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato (PIP₃) na membrana plasmática, iniciando a formação de complexos multienzimáticos na superfície citosólica da membrana. A formação de PIP₃ em resposta a sinais extracelulares, portanto, agrupa as proteínas em complexos de sinalização na superfície da membrana plasmática (ver Figura 12-20).

Os esfingolipídeos de membrana também podem servir como fontes de mensageiros intracelulares. Tanto a ceramida quanto a esfingomielina (Figura 10-12) são potentes reguladores das proteínas-cinase, e a ceramida ou seus derivados estão envolvidos na regulação da divisão celular, diferenciação, migração e morte celular programada (também chamada de apoptose; ver Capítulo 12).

Os eicosanoides carregam mensagens a células próximas

Os eicosanoides são hormônios parácrinos, substâncias que atuam somente em células próximas ao ponto de síntese dos hormônios, em vez de serem transportadas no sangue para atuar em células de outros tecidos ou

órgãos. Esses derivados de ácidos graxos têm vários efeitos significativos nos tecidos dos vertebrados. Estão envolvidos na função reprodutiva, na inflamação, na febre e na dor associadas a ferimentos ou a doenças, na formação de coágulos sanguíneos e na regulação da pressão sanguínea, na secreção de ácido gástrico e em vários outros processos importantes na saúde ou na doença de seres humanos.

Os eicosanóides são derivados do araquidonato (ácido araquidônico; $20:4(\Delta^{5,8,11,14})$) e do ácido eicosapentaenoico (EPA; $20:5(\Delta^{5,8,11,14,17})$), dos quais vem seu nome genérico (do grego, *eikosi*, “vinte”). Há quatro classes principais de eicosanóides: prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e lipoxinas (Figura 10-17). Os nomes dos eicosanóides incluem designações usando letras para os grupos funcionais no anel e números indicando o número de ligações duplas na cadeia hidrocarbonada.

As **prostaglandinas (PG)** contêm um anel de cinco carbonos. Seu nome deriva da glândula próstata, o tecido a partir do qual elas foram isoladas pela primeira vez por Bengt Samuelsson e Sune Bergström. A PGE_2 e outras prostaglandinas da série 2 são sintetizadas a partir do araquidonato; prostaglandinas da série 3 são derivadas do EPA (ver Figura 21-12). As prostaglandinas apresentam diversas funções. Algumas estimulam a contração da musculatura lisa do útero durante a menstruação e o trabalho de parto. Outras afetam o fluxo sanguíneo a órgãos específicos, o ciclo sono-vigília e a sensibilidade de certos tecidos a hormônios como a adrenalina e o glucagon. As prostaglandinas de um terceiro grupo elevam a temperatura corporal (produzindo a febre) e causam inflamação e dor.

Os **tromboxanos (TX)** têm um anel de seis membros que contém um éter. São produzidos pelas plaquetas (tam-

bém chamadas de trombócitos) e atuam na formação dos coágulos e na redução do fluxo sanguíneo no local do coágulo. Como mostrado por John Vane, os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) – ácido acetilsalicílico, ibuprofeno e meclofenamato, por exemplo – inibem a enzima prostaglandina H_2 -sintase (também chamada de ciclooxigenase-2, ou COX-2), que catalisa um dos passos iniciais na rota de produção de prostaglandinas da série 2 e de tromboxanos a partir do araquidonato (Figura 10-17) e na rota de produção de prostaglandinas da série 3 e de tromboxanos a partir do EPA (ver Figura 21-12).

Os **leucotrienos (LT)**, inicialmente encontrados em leucócitos, contêm três ligações duplas conjugadas. Eles são poderosos sinais biológicos. Por exemplo, o leucotrieno D_4 , derivado do leucotrieno A_4 , induz a contração da musculatura lisa que envolve as vias aéreas até o pulmão. A produção excessiva de leucotrienos causa a crise de asma, e a síntese de leucotrienos é um dos alvos dos fármacos antiastmáticos, como a prednisona. A forte contração da musculatura lisa dos pulmões que ocorre durante o choque anafilático é parte da reação alérgica potencialmente fatal em indivíduos hipersensíveis a ferroadas de abelha, penicilina ou outros agentes.

As **lipoxinas (LX)**, como os leucotrienos, são eicosanóides lineares. A característica que as distingue é a presença de diversos grupos hidroxila ao longo da cadeia (Figura 10-17). Esses compostos são potentes agentes anti-inflamatórios. Uma vez que sua síntese é estimulada por doses baixas de ácido acetilsalicílico (81 mg) administrada diariamente, essa dose baixa é comumente prescrita para indivíduos com doenças cardiovasculares. ■

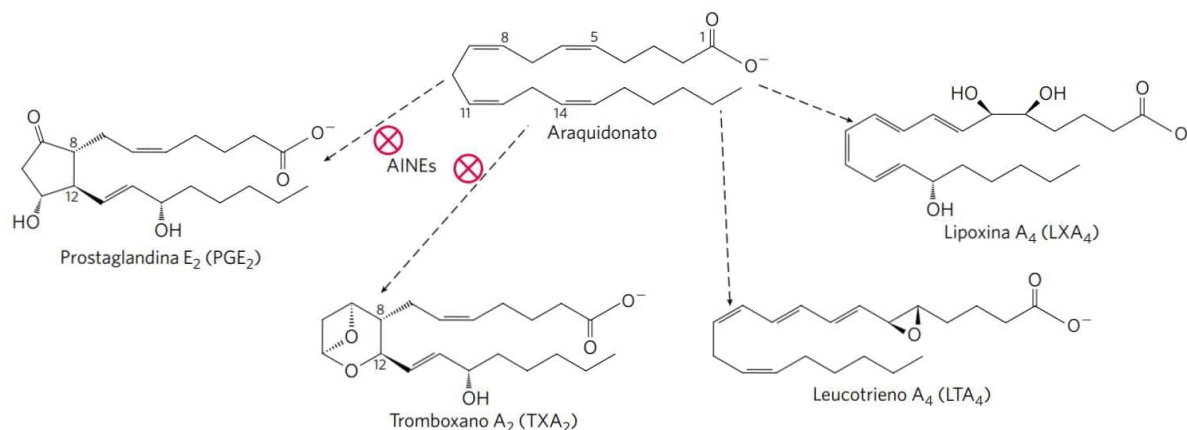


FIGURA 10-17 O ácido araquidônico e alguns derivados de eicosanóides.

O ácido araquidônico (araquidonato em pH 7) é o precursor dos eicosanóides, incluindo prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e lipoxinas. Na prostaglandina E_2 , o C-8 e o C-12 do araquidonato juntam-se para formar o característico anel com cinco membros. No tromboxano A_2 , o C-8 e o C-12 juntam-se e um átomo de oxigênio é adicionado para formar o anel de seis membros. Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), como o ácido acetilsalicílico e o ibuprofeno, bloqueiam a formação de prostaglandinas e tromboxanos a partir do araquidonato pela inibição da enzima ciclooxigenase (prostaglandina H_2 -sintase). O leucotrieno A_4 tem uma série de três ligações duplas conjugadas e não apresenta uma porção cíclica. As lipoxinas também são derivados não cíclicos do araquidonato, com diversos grupos hidroxila.



John Vane (1927-2004), Sune Bergström (1916-2004) e Bengt Samuelsson [Fonte: Ira Wyman/Sygma/Corbis.]

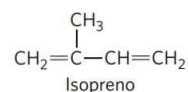
Os hormônios esteroides carregam mensagens entre os tecidos

Os esteroides são derivados oxidados dos esteróis; eles têm o núcleo esterol, mas não a cadeia alquila ligada ao anel D do colesterol, e são mais polares que o colesterol. Os hormônios esteroides circulam pela corrente sanguínea (em carreadores proteicos) do local onde foram produzidos até os tecidos-alvo, onde entram nas células, ligam-se a receptores proteicos altamente específicos no núcleo e causam mudanças na expressão gênica e, portanto, no metabolismo. Como os hormônios têm afinidade muito alta por seus receptores, concentrações muito baixas (nanomolar ou menos) são suficientes para produzir respostas nos tecidos-alvo. Os principais grupos de hormônios esteroides são os hormônios sexuais masculinos e femininos e os hormônios produzidos pelo córtex da glândula suprarrenal, pelo cortisol e pela aldosterona (**Figura 10-18**). A prednisona e a prednisolona são fármacos esteroides com atividades anti-inflamatórias potentes, mediadas, em parte, pela inibição da liberação do araquidonato pela fosfolipase A₂ e pela consequente inibição da síntese de leucotrienos, prostaglandinas, tromboxanos e lipoxinas. Elas têm uma série de aplicações médicas, incluindo o tratamento de asma e de artrite reumatoide. ■

As plantas vasculares contêm um composto tipo esteroide, o brassinolídeo (**Figura 10-18**), potente regulador do crescimento, que aumenta a taxa de alongamento do caule e afeta a orientação das microfibrilas de celulose na parede celular durante o crescimento.

As plantas vasculares produzem milhares de sinais voláteis

As plantas produzem milhares de diferentes compostos lipofílicos, substâncias voláteis utilizadas para atrair os polinizadores, para repelir herbívoros, para atrair organismos que defendem a planta contra herbívoros e para a comunicação com outras plantas. O jasmonato, por exemplo, um derivado do ácido graxo 18:3($\Delta^{9,12,15}$) em lipídeos de membrana, ativa as defesas da planta em resposta ao dano infligido por insetos. O metil éster de jasmonato dá a fragrância característica do óleo de jasmim, amplamente utilizado na indústria de perfumes. Muitas substâncias voláteis produzidas por plantas, incluindo o geraniol (que dá o aroma característico dos gerânios), o β -pineno (aroma de madeira de pinheiro), o limoneno (de limas), o mentol e a carvona (ver **Figura 1-25a**), são derivadas de ácidos graxos ou de compostos produzidos pela condensação de unidades de isopreno de cinco carbonos.



As vitaminas A e D são precursoras de hormônios

Durante as primeiras décadas do século XX, um grande foco de pesquisa em química fisiológica foi a identificação das **vitaminas**, compostos essenciais para a saúde do homem e de outros vertebrados, mas que não podem ser sintetizados por esses animais e devem, portanto, ser obtidos da dieta. Os primeiros estudos nutricionais identificaram duas classes gerais desse tipo de composto: os que

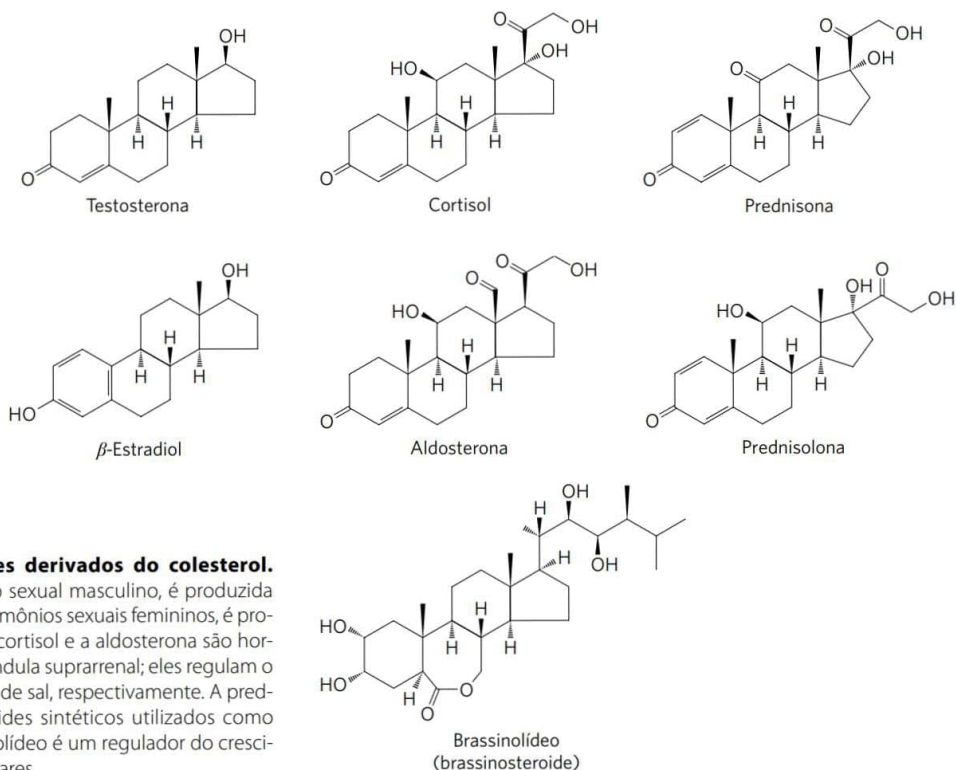


FIGURA 10-18 Esteroides derivados do colesterol.

A testosterona, o hormônio sexual masculino, é produzida nos testículos. O estradiol, um dos hormônios sexuais femininos, é produzido nos ovários e na placenta. O cortisol e a aldosterona são hormônios sintetizados no córtex da glândula suprarrenal; eles regulam o metabolismo da glicose e a excreção de sal, respectivamente. A prednisona e a prednisolona são esteroides sintéticos utilizados como agentes anti-inflamatórios. O brassinolídeo é um regulador do crescimento encontrado em plantas vasculares.

eram solúveis em solventes orgânicos apolares (vitaminas lipossolúveis) e os que podiam ser extraídos dos alimentos com solventes aquosos (vitaminas hidrossolúveis). Posteriormente, o grupo lipossolúvel foi dividido nos quatro grupos das vitaminas A, D, E e K, todos compostos isoprenoides sintetizados pela condensação de várias unidades de isopreno. Dois deles (D e A) servem como precursores de hormônios.

A **vitamina D₃**, também chamada de **colecalfiferol**, normalmente é formada na pele a partir de 7-desidrocolesterol em uma reação fotoquímica catalisada pelo componente UV da luz solar (**Figura 10-19a**). A vitamina D₃ não é biologicamente ativa, mas é convertida por enzimas no fígado e no rim a 1 α ,25-di-hidroxivitamina D₃ (calcitriol), hormônio que regula a captação de cálcio no intestino e os níveis de cálcio no rim e nos ossos. A deficiência de vitamina D leva à formação defeituosa dos ossos e a uma doença chamada raquitismo, para a qual a administração de vitamina D produz uma cura dramática (**Figura 10-19b**). A vitamina D₂ (ergocalciferol) é um produto comercial formado pela irradiação com UV do ergosterol de levedura. A vitamina D₂ é estruturalmente semelhante à D₃, com leve modificação da cadeia lateral ligada ao anel D do esterol. Ambas têm os mesmos efeitos biológicos, e a D₂ é comumente adicionada ao leite e à manteiga como suplemento alimentar. O produto do metabolismo da vitamina D, 1 α ,25-di-hidroxivitamina D₃, regula a expressão gênica, interagindo com receptores proteicos nucleares específicos (pp. 1156-1157).

A **vitamina A₁ (todo-*trans*-retinol)** e seus metabólitos oxidados, o ácido retinoico e o retinal, agem nos processos de desenvolvimento, crescimento e diferencia-

ção celular e na visão (**Figura 10-20**). A vitamina A₁ ou β -caroteno presente na dieta pode ser convertida enzimaticamente em todo-*trans*-ácido retinoico, um hormônio retinoide que atua via uma família de proteínas receptoras nucleares (RAR, RXR, PPAR) para regular a expressão de genes centrais para o desenvolvimento embrionário, para a diferenciação de células-tronco e a proliferação celular. O todo-*trans*-ácido retinoico é usado no tratamento de certos tipos de leucemia, e é o ingrediente ativo do medicamento tretinoína (Retin-A), usado para tratar acne grave e linhas de expressão na pele. No olho de vertebrados, o retinal ligado à proteína opsina forma o pigmento rodopsina dos fotorreceptores. A conversão fotoquímica de 11-*cis*-retinal em todo-*trans*-retinal é o evento fundamental na visão (ver **Figura 12-14**).

Ao contrário de muitas vitaminas, a vitamina A pode ser armazenada por algum tempo no organismo (principalmente na forma de éster com o ácido palmítico, no fígado). A vitamina A foi primeiro isolada de óleos de fígado de peixe; ovos, leite integral e manteiga também são boas fontes. Uma outra fonte é o β -caroteno (**Figura 10-20**), o pigmento responsável pela coloração característica da cenoura, da batata doce e de outros vegetais amarelos. O caroteno é um entre um grande número (> 700) de **carotenoides**, produtos naturais com um sistema extenso e característico de ligações duplas conjugadas, que possibilita sua forte absorção da luz visível (450-470 nm).

A deficiência de vitamina A durante a gestação pode levar a malformações congênitas e retardo no crescimento do bebê. Em adultos, a vitamina A é também essencial para a visão, a imunidade e a reprodução. A deficiência de vitamí-

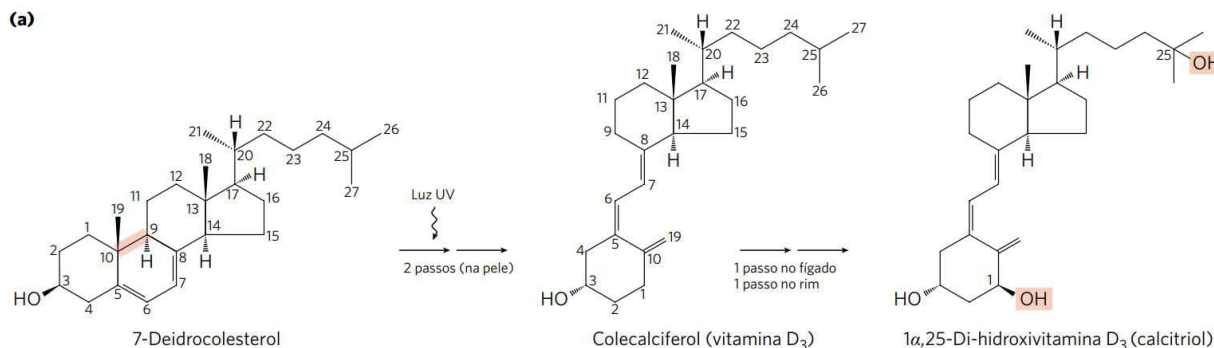


FIGURA 10-19 Produção e metabolismo da vitamina D₃. (a) O colescalfiferol (vitamina D₃) é produzido na pele pela irradiação UV do 7-desidrocolesterol, que rompe a ligação que está em cor salmão. No fígado, um grupo hidroxila é adicionado em C-25; no rim, uma segunda hidroxilação em C-1 produz o hormônio ativo, 1 α ,25-di-hidroxivitamina D₃. Esse hormônio regula o metabolismo do Ca²⁺ nos rins, nos intestinos e nos ossos. (b) A vitamina D da dieta evita o raquitismo, uma doença antigamente comum em climas frios, em que as roupas pesadas bloqueiam o componente UV da luz solar necessário para a produção da vitamina D₃ na pele. Neste detalhe de um grande mural de John Stuart Curry, *Os benefícios sociais da pesquisa bioquímica* (1943), as pessoas e os animais à esquerda representam os efeitos de uma nutrição pobre, incluindo as pernas arqueadas de um menino com raquitismo clássico. À direita estão as pessoas e os animais mais saudáveis pelos "benefícios sociais da pesquisa", incluindo o uso da vitamina D para prevenir e tratar o raquitismo. [Fonte: (b) cortesia do Centro de Mídia, Universidade de Wisconsin-Madison, Departamento de Bioquímica.]

(b)



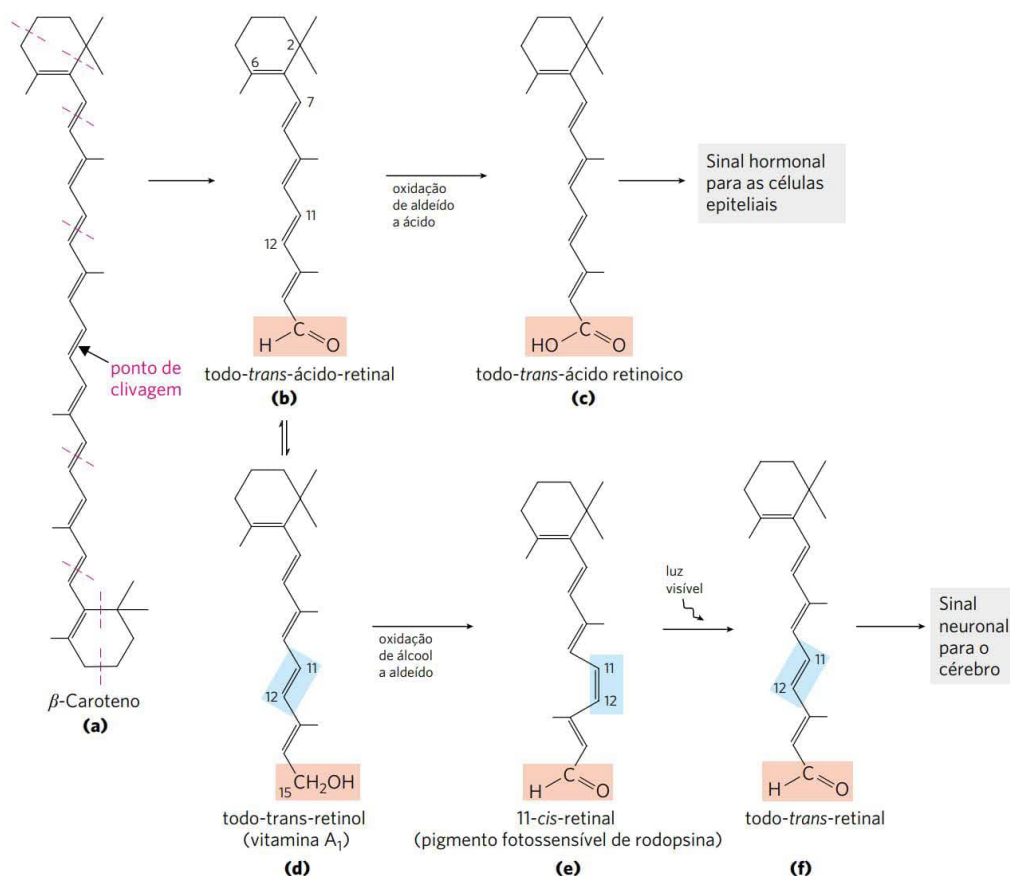


FIGURA 10-20 β -Caroteno da dieta e vitamina A_1 como precursores de retinoides. (a) O β -caroteno é mostrado com suas unidades estruturais isopreno ressaltadas por linhas vermelhas tracejadas. A clivagem simétrica do β -caroteno produz duas moléculas de todo-trans-retinal (b), o qual pode ser posteriormente oxidado a todo-trans-ácido retinoico, um hormônio retinoide (c), ou reduzido a todo-trans-retinol, vitamina A_1 (d). Na via visual, o todo-trans-retinol obtido nessa reação, ou obtido diretamente da dieta, pode ser convertido no aldeído 11-cis-retinal (e). Esse produto se combina com a proteína opsina para formar rodopsina (não mostrada), pigmento visual amplamente disseminado na natureza. No escuro, o retinal da rodopsina está na forma 11-cis. Quando a molécula de rodopsina é excitada pela luz visível, o 11-cis-retinal passa por uma série de reações fotoquímicas que o convertem em retinal todo-trans (f), forçando uma mudança na forma de toda a molécula de rodopsina. Essa transformação nos bastonetes da retina dos vertebrados emite um sinal elétrico para o encéfalo que é a base da transdução visual (ver Figura 12-14).

na A leva a uma variedade de sintomas, incluindo secura da pele, olhos e mucosas e cegueira noturna, um sintoma inicial comumente utilizado para o diagnóstico de deficiência de vitamina A. Estima-se que a deficiência de vitamina A cause, no mundo em desenvolvimento, um milhão ou mais de casos de cegueira ou morte anualmente. Uma estratégia efetiva para fornecer vitamina A à população é a engenharia metabólica de linhagens de arroz capazes de produzir β -caroteno em excesso. O arroz tem toda a maquinaria enzimática de produção de β -caroteno em suas folhas, mas essas enzimas são menos ativas no grão. A introdução de dois genes no arroz resultou no "arroz dourado", com grãos bastante enriquecidos em β -caroteno (Figura 10-21). ■

As vitaminas E e K e as quinonas lipídicas são cofatores de oxirredução



Vitamina E é o nome coletivo para um grupo de lipídeos bastante relacionados, chamados de **tocoferóis**, que contêm um anel aromático substituído e uma cadeia lateral longa de isoprenoide (Figura 10-22a). Por

serem hidrofóbicos, os tocoferóis associam-se com as membranas celulares, com os depósitos de lipídeos e com as lipoproteínas no sangue. Os tocoferóis são antioxidantes biológicos. O anel aromático reage com as formas mais reativas de radicais de oxigênio e outros radicais livres e os destrói, protegendo os ácidos graxos insaturados da oxidação e impedindo o dano oxidativo aos lipídeos de membrana, o que pode causar fragilidade celular. Os tocoferóis são encontrados nos ovos e nos óleos vegetais e são especialmente abundantes no germe de trigo. Animais de laboratório alimentados com dietas deficientes em vitamina E desenvolvem pele escamosa, fraqueza e atrofia muscular e esterilidade. A deficiência de vitamina E em seres humanos é muito rara; o principal sintoma é a fragilidade dos eritrócitos.

O anel aromático da **vitamina K** (Figura 10-22b) sofre um ciclo de oxidação e redução durante a formação da protrombina ativa, uma proteína do plasma sanguíneo que é essencial para a coagulação do sangue. A protrombina é uma enzima proteolítica que quebra ligações peptídicas na proteína sanguínea fibrinogênio para convertê-la em fibrina, a proteína fibrosa insolúvel que une os coágulos sanguíneos

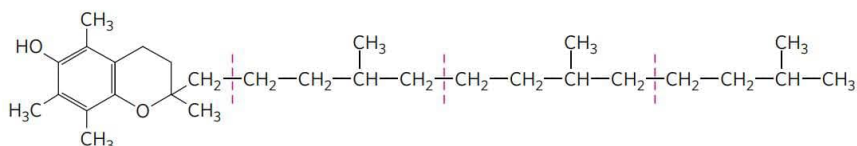


FIGURA 10-21 Arroz enriquecido com caroteno. No mundo todo, cerca de 200 milhões de mulheres e crianças sofrem de deficiência de vitamina A, que causa 500 mil casos de cegueira irreversível e até 2 milhões de mortes anualmente, particularmente em regiões onde o arroz é um alimento básico. Um esforço humanitário internacional – o projeto arroz dourado – tem realizado avanços na tentativa de sanar essa crise da saúde. Os grãos de arroz do tipo selvagem (à esquerda) não produzem β -caroteno, o precursor metabólico da vitamina A. Essa planta foi submetida à engenharia genética para produzir em seu grão, o β -caroteno. O grão, assim, assume a coloração amarela do caroteno (à direita). Uma dieta suplementada com esse arroz fornece β -caroteno em quantidade suficiente para prevenir a deficiência de vitamina A e suas trágicas consequências. [Fonte: © Golden Rice Humanitarian Board (www.goldenrice.org).]

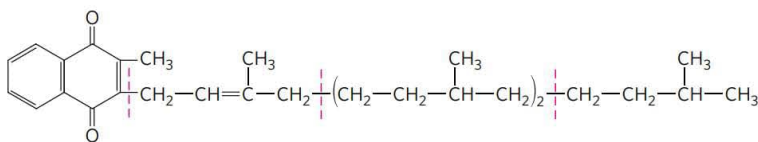
(ver Figura 6-40). Henrik Dam e Edward A. Doisy descobriram de forma independente que a deficiência de vitamina K retarda a coagulação sanguínea, o que pode ser fatal. A deficiência dessa vitamina é extremamente incomum em seres humanos, com exceção de uma pequena porcentagem

de bebês que sofrem da doença hemorrágica do recém-nascido, condição potencialmente fatal. Nos Estados Unidos, os recém-nascidos recebem rotineiramente uma injeção de 1 mg de vitamina K. A vitamina K₁ (filoquinona) é encontrada nas folhas de plantas verdes; uma forma relacionada, a

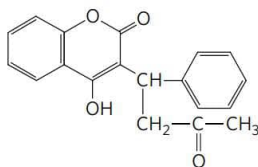
(a)
Vitamina E: antioxidante



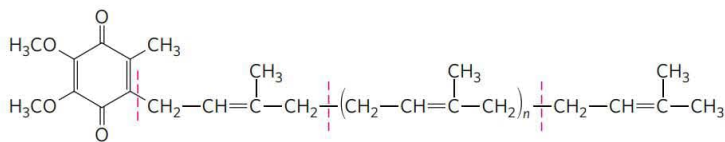
(b)
Vitamina K₁: cofator da coagulação sanguínea (filoquinona)



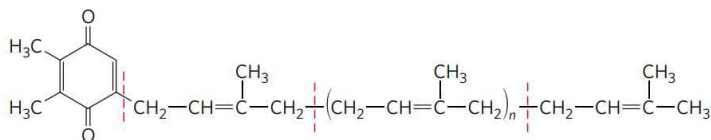
(c)
Warfarina: anticoagulante sanguíneo



(d)
Ubiquinona: transportador de elétrons da mitocôndria (coenzima Q) ($n = 4$ a 8)



(e)
Plastoquinona: transportador de elétrons do cloroplasto ($n = 4$ a 8)



(f)
Dolicol: transportador de açúcar ($n = 9$ a 22)

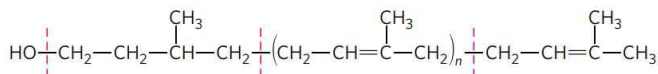


FIGURA 10-22 Alguns outros compostos isoprenoides ou derivados biologicamente ativos. As unidades derivadas do isopreno estão indicadas com linhas vermelhas tracejadas. Na maioria dos tecidos de mamíferos, a ubiquinona (também chamada de coenzima Q) tem 10 unidades de isopreno. Os dolicóis dos animais têm de 17 a 21 unidades de isopreno (85 a 105 átomos de carbono), os dolicóis bacterianos têm 11, e os de plantas e fungos têm de 14 a 24.

vitamina K₂ (menaquinona), é produzida por bactérias que vivem no intestino de vertebrados.

A varfarina (Figura 10-22c) é um composto sintético que inibe a formação de protrombina ativa. É especialmente venenosa para ratos, causando morte por hemorragia interna. De modo irônico, esse potente raticida também é um fármaco anticoagulante inestimável para tratar seres humanos em risco por coagulação sanguínea excessiva, como os pacientes cirúrgicos e aqueles com trombose coronária. ■

A ubiquinona (também chamada de coenzima Q) e a plastoquinona (Figura 10-22d, e) são isoprenoides que funcionam como transportadores lipofílicos de elétrons em reações de oxirredução que levam à síntese de ATP na mitocôndria e nos cloroplastos, respectivamente. Ambas podem aceitar um ou dois elétrons e um ou dois prótons (ver Figura 19-3).

Os dolícóis ativam precursores de açúcares para a biossíntese

Durante a síntese dos carboidratos complexos das paredes celulares bacterianas e durante a adição de unida-

des de polissacarídeo a certas proteínas (glicoproteínas) e lipídeos (glicolipídeos) em eucariotos, as unidades de açúcar a serem adicionadas são quimicamente ativadas pela ligação a álcoois isoprenoides, chamados de **dolícóis** (Figura 10-22f). Esses compostos têm fortes interações hidrofóbicas com lipídeos de membrana, ancorando na membrana os açúcares ligados, onde participam de reações de transferência de açúcares.

Muitos pigmentos naturais são dienos conjugados a lipídeos

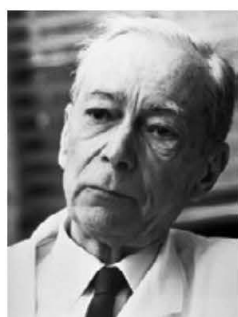
Os dienos conjugados possuem cadeias carbonadas com ligações simples e duplas alternadas. Como esse arranjo estrutural permite o movimento dos elétrons, os compostos podem ser excitados por radiações eletromagnéticas de baixa energia (luz visível), dando a eles cores visíveis para seres humanos e outros animais. O caroteno (Figura 10-20) é amarelo-alaranjado; compostos semelhantes dão às penas das aves seus vistosos vermelhos, alaranjados e amarelos (Figura 10-23).

Como os esteróis, esteroides, dolícóis, vitaminas A, E, D e K, ubiquinona e plastoquinona, esses pigmentos são sintetizados a partir de derivados de isopreno de cinco carbonos; a via biossintética é descrita em detalhes no Capítulo 21.

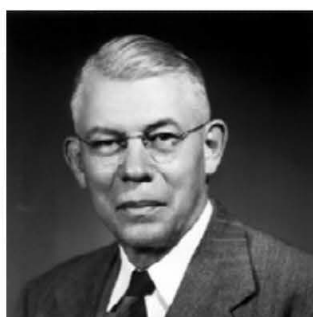
Os policetídeos são produtos naturais com atividades biológicas



Os **policetídeos** são um grupo de lipídeos variados com vias biossintéticas semelhantes (condensação de Claisen) àquelas dos ácidos graxos. Eles são **metabólitos secundários**, compostos que não fazem parte do metabolismo central de um organismo, mas que participam de alguma função secundária capaz de dar ao organismo uma vantagem em algum nicho ecológico. Muitos policetídeos podem ser usados em medicina como antibióticos (eritromicina), antifúngicos (anfotericina B), ou inibidores da síntese de colesterol (lovastatina) (Figura 10-24). ■



Henrik Dam, 1895-1976
[Fonte: Science Source.]



Edward A. Doisy, 1893-1986
[Fonte: National Library of Medicine/Science Photo Library/Science Source.]

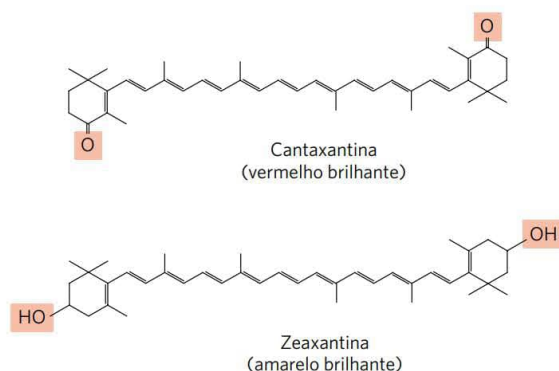
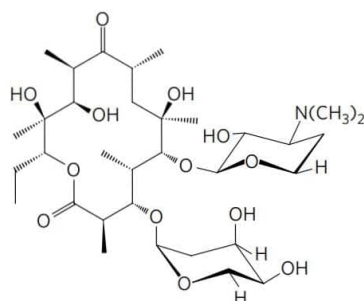
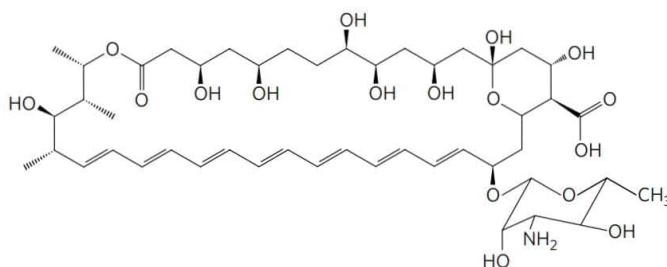


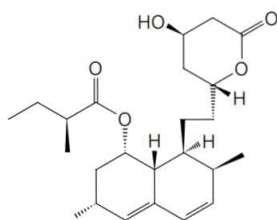
FIGURA 10-23 Lipídeos como pigmentos nas plantas e nas penas das aves. Compostos com sistemas conjugados longos absorvem luz na região visível do espectro. As diferenças sutis na química desses compostos produzem pigmentos de cores notavelmente diferentes. As aves adquirem os pigmentos que dão as cores vermelha ou amarela às suas penas comendo materiais de plantas que contêm pigmentos carotenoides, como a cantaxantina e a zeaxantina. As diferenças na pigmentação entre machos e fêmeas de aves são resultado de diferenças na absorção intestinal e no processamento dos carotenoides. [Fontes: Cardeal: Dr. Dan Sudia/Science Source. Pintassilgo: Richard Day/VIREO.]



Eritromicina (antibiótico)



Anfotericina B (antifúngico)



Lovastatina (estatina)

**FIGURA 10-24** Três policetídeos naturais usados na medicina humana.

- Os lipídeos que contêm dienos conjugados servem como pigmentos nas flores e nos frutos e dão às penas das aves suas cores vistosas.
- Os policetídeos são produtos naturais amplamente usados na medicina.

RESUMO 10.3 Lipídeos como sinalizadores, cofatores e pigmentos

- Alguns tipos de lipídeos, embora presentes em quantidades relativamente baixas, desempenham papéis cruciais como cofatores ou sinalizadores.
- O fosfatidilinositol-bisfosfato é hidrolisado para produzir dois mensageiros intracelulares, o diacilglicerol e o inositol-1,4,5-trisfosfato. O fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato é um ponto de nucleação para complexos proteicos supramoleculares envolvidos na sinalização biológica.
- Prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e lipoxinas são todos eicosanoides, derivados do araquidonato e hormônios extremamente potentes.
- Os hormônios esteroides, como, por exemplo, os hormônios sexuais, são derivados dos esteróis. Eles servem como poderosos sinalizadores biológicos, alterando a expressão gênica nas células-alvo.
- As vitaminas D, A, E e K são compostos lipossolúveis constituídos por unidades de isopreno. Todas desempenham papéis essenciais no metabolismo ou na fisiologia dos animais. A vitamina D é precursora de um hormônio que regula o metabolismo do cálcio. A vitamina A fornece o pigmento fotossensível do olho dos vertebrados e é um regulador da expressão gênica durante o crescimento das células epiteliais. A vitamina E funciona na proteção dos lipídeos de membrana contra o dano oxidativo, e a vitamina K é essencial no processo de coagulação sanguínea.
- As ubiquinonas e as plastoquinonas, também derivadas de isoprenoides, são transportadores de elétrons nas mitocôndrias e nos cloroplastos, respectivamente.
- Os dolícois ativam e ancoram os açúcares às membranas celulares; os grupos açúcar são, então, utilizados na síntese de carboidratos complexos, glicolipídeos e glicoproteínas.

10.4 Trabalhando com lipídeos

Como os lipídeos são insolúveis em água, sua extração e seu posterior fracionamento requerem o uso de solventes orgânicos e de algumas técnicas pouco utilizadas na purificação de moléculas hidrossolúveis, como as proteínas e os carboidratos. Em geral, misturas complexas de lipídeos são separadas por diferenças na polaridade ou na solubilidade em solventes apolares. Os lipídeos que contêm ácidos graxos unidos por ligação éster ou amida podem ser hidrolisados pelo tratamento com ácido ou base ou com enzimas hidrolíticas específicas (fosfolipases, glicosidasas) para liberar seus componentes para análise. Alguns métodos comumente utilizados nas análises de lipídeos são mostrados na **Figura 10-25** e discutidos a seguir.

A extração de lipídeos requer solventes orgânicos

Os lipídeos neutros (triacilgliceróis, ceras, pigmentos, etc.) são prontamente extraídos dos tecidos com éter etílico, clorofórmio ou benzeno, solventes que não permitem a agregação causada pelas interações hidrofóbicas. Os lipídeos de membrana são melhor extraídos por solventes orgânicos mais polares, como o etanol ou o metanol, que reduzem as interações hidrofóbicas entre as moléculas lipídicas enquanto também enfraquecem as ligações de hidrogênio e as interações eletrostáticas que ligam os lipídeos de membrana às proteínas de membrana. Um extrator bastante utilizado é uma mistura de clorofórmio, metanol e água, inicialmente em proporções de volume (1:2:0,8) que são miscíveis, produzindo uma única fase. Depois que o tecido é homogeneizado nesse solvente para extrair todos os lipídeos, mais água é adicionada ao extrato resultante, e a mistura separa-se em duas fases, metanol/água (fase superior) e clorofórmio (fase inferior). Os lipídeos permanecem na camada com clorofórmio, e as moléculas mais polares, como as proteínas e os açúcares, repartem-se na camada de metanol/água (**Figura 10-25a**).

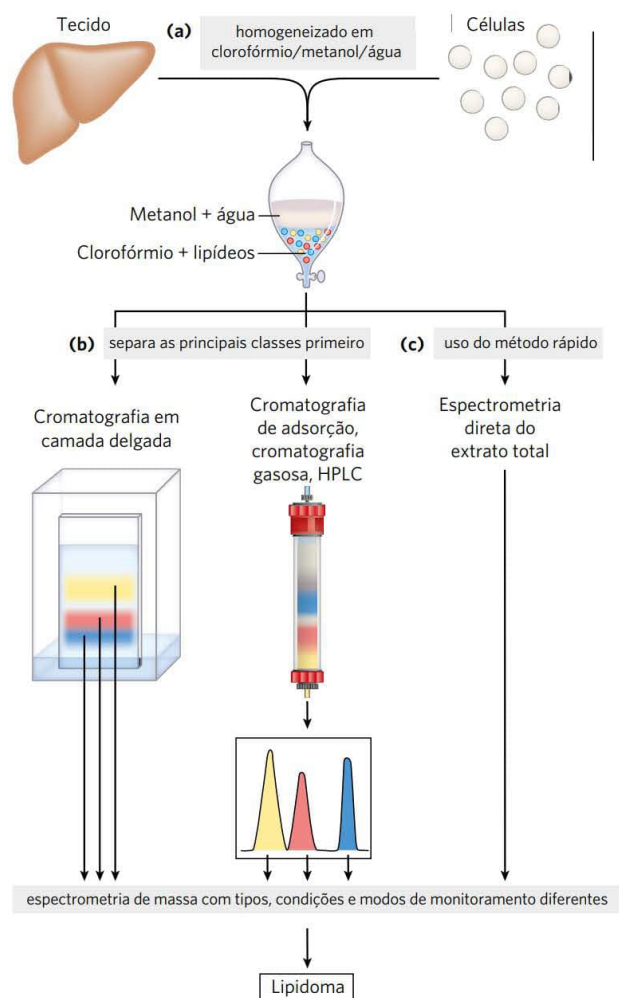


FIGURA 10-25 Procedimentos comuns na extração, na separação e na identificação de lipídeos celulares. (a) O tecido é homogeneizado em uma mistura de clorofórmio/metanol/água, que gera duas fases com a adição de água e a remoção dos sedimentos não extraíveis por centrifugação. (b) As principais classes dos lipídeos extraídos na fase clorofórmio podem ser primeiro separadas por cromatografia de camada delgada (CCD), na qual os lipídeos são carregados para cima em uma placa coberta de sílica-gel por uma frente ascendente de solvente, com os lipídeos menos polares migrando mais do que os lipídeos mais polares ou carregados, ou por cromatografia de adsorção em uma coluna de sílica-gel em que passam solventes de polaridade crescente. Por exemplo, cromatografia em coluna com solventes apropriados pode ser usada para separar espécies lipídicas intimamente relacionadas, como fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e fosfatidilinositol. Uma vez separados, os ácidos graxos constituintes de cada lipídeo podem ser determinados por espectrometria de massa. (c) De modo alternativo, no método rápido, um extrato de lipídeos não fracionado pode ser diretamente submetido à espectrometria de massa de alta resolução de diferentes tipos e sob condições distintas para determinar a composição total de todos os lipídeos – isto é, o lipidoma.

A cromatografia de adsorção separa lipídeos de polaridades diferentes

Misturas complexas de lipídeos dos tecidos podem ser fracionadas por procedimentos cromatográficos com base nas diferentes polaridades de cada classe de lipídeo (Figura

10-25b). Na cromatografia de adsorção, um material insolúvel polar, como sílica-gel (uma forma de ácido silícico, $\text{Si}(\text{OH})_4$), é colocado em uma coluna de vidro, e a mistura de lipídeos (na solução de clorofórmio) é aplicada no topo da coluna. (Na cromatografia líquida de alto desempenho, a coluna é menor em diâmetro e uma alta pressão força os solventes através da coluna.) Os lipídeos polares ligam-se fortemente ao ácido silícico, e os lipídeos neutros passam diretamente através da coluna e emergem na primeira eluição com clorofórmio. Os lipídeos polares são, então, eluídos em ordem crescente de polaridade, quando se lava a coluna com solventes de polaridade progressivamente mais alta. Os lipídeos polares não carregados (p. ex., cerebrosideos) são eluídos com acetona, e lipídeos muito polares ou carregados (p. ex., glicerosfolipídeos) são eluídos com metanol.

A cromatografia em camada delgada em ácido silícico aplica o mesmo princípio (Figura 10-25b). Uma fina camada de sílica-gel é espalhada sobre uma placa de vidro, à qual ela se adere. Uma pequena amostra de lipídeos dissolvidos em clorofórmio é aplicada perto de uma das margens da placa; essa margem é imersa em um recipiente raso com um solvente orgânico ou uma mistura de solventes; o conjunto é colocado em uma câmara saturada com vapor do solvente. À medida que o solvente ascende pela placa por capilaridade, ele carrega os lipídeos com ele. Os lipídeos menos polares migram mais, pois têm menor tendência de se ligarem ao ácido silícico. Os lipídeos separados podem ser detectados pela pulverização da placa com um corante (rodamina) que emite fluorescência quando associado aos lipídeos, ou pela exposição da placa a vapores de iodo. O iodo reage reversivelmente com as ligações duplas nos ácidos graxos, de forma que os lipídeos que contêm ácidos graxos insaturados desenvolvem uma coloração amarela ou marrom. Vários outros reagentes de pulverização também são úteis na detecção de lipídeos específicos. Para análise subsequente, as regiões que contêm lipídeos isolados podem ser raspadas da placa e os lipídeos podem ser recuperados por meio de extração com um solvente orgânico.

A cromatografia gasosa separa misturas de derivados voláteis de lipídeos

A cromatografia gasosa (CG) separa os componentes voláteis de uma mistura de acordo com suas tendências relativas de se dissolverem no material inerte contido na coluna cromatográfica ou de se volatilizarem e migrarem através da coluna, carregados por uma corrente de um gás inerte, como o hélio. Alguns lipídeos são naturalmente voláteis, mas a maioria necessita ser primeiro derivatizada para aumentar sua volatilidade (i.e., diminuir seu ponto de ebulição). Para uma análise dos ácidos graxos em uma amostra de fosfolipídeos, os lipídeos são primeiro transesterificados: aquecidos em uma mistura de metanol/HCl ou metanol/NaOH para converter os ácidos graxos esterificados com o glicerol nos seus respectivos ésteres de metila. Esses ésteres de acilas graxas são, então, aplicados em coluna de cromatografia gasosa, e a coluna é aquecida para volatilizar os compostos. Os ésteres de acilas graxas mais solúveis no material da coluna repartem-se (dissolvem-se) naquele material; os lipídeos menos solúveis são carregados pela corrente de gás inerte e emergem primeiro da coluna. A ordem de eluição depende

da natureza do adsorvente sólido na coluna e do ponto de ebulição dos componentes da mistura lipídica. Utilizando-se essas técnicas, as misturas de ácidos graxos de vários comprimentos de cadeia e vários graus de insaturação podem ser completamente separadas.

A hidrólise específica auxilia na determinação das estruturas dos lipídeos

Algumas classes de lipídeos são suscetíveis à degradação sob condições específicas. Por exemplo, todos os ácidos graxos com ligação éster nos triacilgliceróis, fosfolipídeos e ésteres de esteroide são liberados por tratamento fracamente ácido ou alcalino, e, em condições mais extremas de hidrólise, há liberação dos ácidos graxos ligados com ligação amida, como ocorre nos esfingolipídeos. As enzimas que especificamente hidrolisam certos lipídeos também são úteis na determinação da sua estrutura. As fosfolipases A, C e D (Figura 10-15) clivam ligações específicas nos fosfolipídeos e geram produtos com solubilidades e comportamentos cromatográficos característicos. A fosfolipase C, por exemplo, libera um álcool fosforilado solúvel em água (como a fosfocolina da fosfatidilcolina) e um diacilglicerol solúvel em clorofórmio, cada qual podendo ser caracterizado separadamente para determinar a estrutura do fosfolipídeo intacto. A combinação da hidrólise específica com a caracterização dos produtos pelas cromatografias em camada delgada, gasosa e de alto desempenho frequentemente permite a determinação de uma estrutura lipídica.

A espectrometria de massa revela a estrutura lipídica completa

Para se estabelecer, sem ambiguidade, o comprimento de uma cadeia hidrocarbonada ou a posição das ligações duplas, a análise espectrométrica de massa dos lipídeos ou de seus derivados voláteis é fundamental. As propriedades químicas de lipídeos semelhantes (p. ex., dois ácidos graxos de comprimentos similares insaturados em posições diferentes, ou dois isoprenoides com números diferentes de unidades de isopreno) são muito parecidas, e a ordem de eluição dos vários procedimentos cromatográficos frequentemente não distingue entre eles. No entanto, quando o eluato de uma coluna cromatográfica é analisado por espectrometria de massa, os componentes de uma mistura lipídica podem ser separados e identificados simultaneamente por seus padrões únicos de fragmentação (Figura 10-26). Com o aumento da resolução da espectroscopia de massa, é possível identificar lipídeos individuais em misturas bastante complexas sem primeiro fracionar os lipídeos do extrato bruto. Esse método “rápido” (Figura 10-25c) evita perdas durante as separações preliminares das subclasses de lipídeos e é mais rápido.

O lipidoma busca catalogar todos os lipídeos e suas funções

Na medida em que os bioquímicos que estudam lipídeos foram descobrindo os milhares de diferentes lipídeos de

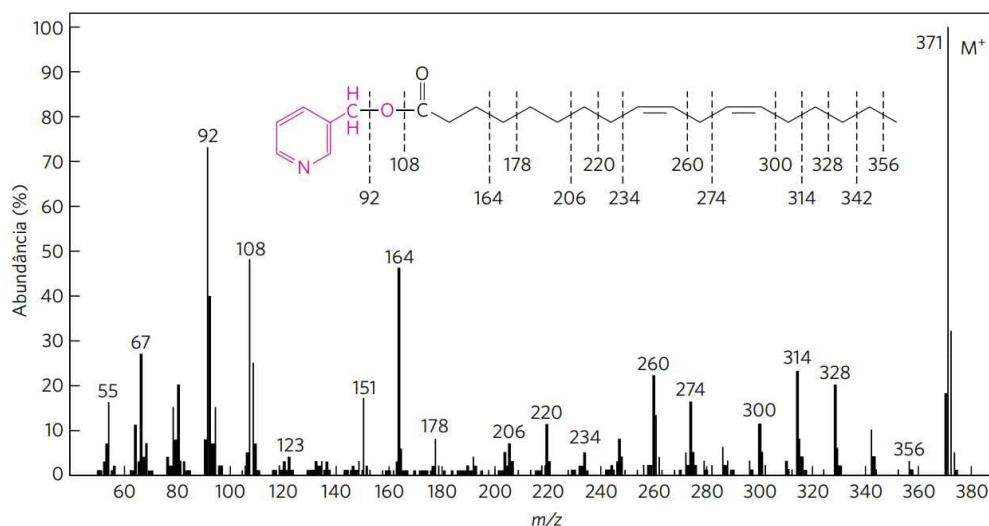


FIGURA 10-26 Determinação da estrutura de ácidos graxos por espectrometria de massa. O ácido graxo é convertido primeiro em um derivado que minimiza a migração das ligações duplas quando a molécula é fragmentada pelo bombardeamento de elétrons. O derivado aqui apresentado é um éster de picolinol do ácido linoleico – 18:2($\Delta^{9,12}$) (M , 371) –, no qual o álcool é o picolinol (em vermelho). Quando bombardeada com uma corrente de elétrons, essa molécula é volatilizada e convertida em um íon precursor (M^+ ; M , 371), no qual o átomo N possui uma carga positiva, e em uma série de fragmentos menores produzidos pela quebra de ligações C-C do ácido graxo. O espectrômetro de massa separa esses fragmentos carregados de acordo com a sua razão massa/carga (m/z). (Para revisar os princípios da espectrometria de massa, ver p. 100-102.) Os íons proeminentes em $m/z = 92$, 108, 151 e 164 contêm o anel de piridina do picolinol e vários fragmentos do grupo carboxila, mostrando que o composto é, de fato, um éster de picolinol. O íon molecular, M^+ ($m/z = 371$), confirma a presença de um ácido graxo C_{18} com duas ligações duplas. A série uniforme de íons separados em 14 unidades de massa molecular (u) uns dos outros representa a perda sucessiva de cada grupo metila e metileno a partir da extremidade metila da cadeia da acila (começando em C-18; a extremidade direita da molécula é mostrada aqui), até que o íon atinja $m/z = 300$. Isso é seguido por uma lacuna de 26 u para os carbonos da ligação dupla terminal, em $m/z = 274$; uma lacuna de 14 u mais adiante para o grupo metileno do C-11, em $m/z = 260$; e assim por diante. Dessa maneira, a estrutura inteira é determinada, ainda que esses dados isolados não revelem a configuração (*cis* ou *trans*) das ligações duplas. [Fonte: W. W. Christie, *Lipid Technol.* 8:64, 1996.]

TABELA 10-2 As oito principais categorias dos lipídeos biológicos

Categoria	Código da categoria	Exemplos
Ácidos graxos	FA	Oleato, estearoil-CoA, palmitoilcarnitina
Glicerolipídeos	GL	Di e triacilgliceróis
Glicerofosfolipídeos	GP	Fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina
Esfingolipídeos	SP	Esfingomielina, gangliosídeo GM2
Lipídeos de esteroide	ST	Colesterol, progesterona e ácidos biliares
Lipídeos de prenol	PR	Farnesol, geraniol, retinol, ubiquinona
Sacarolipídeos	SL	Lipopolissacarídeo
Policetídeos	PK	Tetraciclina, eritromicina e aflatoxina B ₁

ocorrência natural, eles criaram um banco de dados análogo ao Banco de Dados de Proteínas. O portal da lipidômica “LIPID MAPS” (www.lipidmaps.org) tem seu próprio sistema de classificação, que coloca cada tipo de lipídeo em uma de oito categorias químicas, cada uma designada por duas letras (Tabela 10-2). Dentro de cada categoria, distinções mais sutis são indicadas por numerações de classes e subclasses. Por exemplo, todas as glicerofosfolipinas são GP01; o subgrupo de glicerofosfolipinas com dois ácidos graxos em ligação éster é designado GP0101; o subgrupo com um ácido graxo em ligação éter na posição 1 e um em ligação éster na posição 2 é designado GP0102. Ácidos graxos específicos são designados por números que dão a cada lipídeo seu próprio identificador único, de forma que cada lipídeo individual, bem como tipos ainda não descobertos, pode ser descrito sem ambiguidade em termos de um identificador de 12 caracteres, o LM_ID. Um fator utilizado nesse sistema de classificação é a natureza do precursor biossintético. Por exemplo, lipídeos de prenol (como dolícolis e as vitaminas E e K) são formados a partir de precursores isoprenila.

As oito categorias químicas na Tabela 10-2 não coincidem perfeitamente com as categorizações menos formais, baseadas nas funções biológicas, que usamos neste capítulo. Por exemplo, lipídeos estruturais de membrana incluem tanto glicerofosfolipídeos quanto esfingolipídeos, que constituem categorias separadas na Tabela 10-2. Cada método de classificação tem suas vantagens.

A aplicação de técnicas de espectrometria de massa com alta capacidade e alta resolução pode fornecer catálogos quantitativos de todos os lipídeos presentes em um tipo específico de célula, sob condições específicas – o **lipidoma** – e das maneiras nas quais o lipidoma muda com diferenciação, doenças como o câncer ou tratamento com fármacos. Uma célula animal contém mais de mil espécies diferentes de lipídeos, cada qual presumivelmente com uma função específica. Um número crescente de lipídeos possui suas funções conhecidas, porém a grande parte ainda inexplorada do lipidoma oferece uma rica fonte de novos problemas para a próxima geração de bioquímicos e biólogos celulares.

RESUMO 10.4 Trabalhando com lipídeos

- Na determinação da composição de lipídeos, eles devem ser primeiro extraídos dos tecidos com solventes orgânicos e separados por cromatografia em camada delgada,

cromatografia gasosa ou cromatografia líquida de alto desempenho.

- Fosfolipases específicas para uma das ligações em um fosfolipídeo podem ser utilizadas para gerar compostos mais simples para análise subsequente.
- Os lipídeos individuais são identificados por seu comportamento cromatográfico, por sua suscetibilidade à hidrólise por enzimas específicas ou por espectrometria de massa.
- A espectrometria de massa de alta resolução permite a análise de misturas brutas de lipídeos sem pré-fracionamento.
- A lipidômica combina poderosas técnicas de análise para determinar o perfil completo de lipídeos em uma célula ou tecido (o lipidoma) e para montar bases de dados que permitam comparações entre lipídeos de diferentes tipos celulares e sob diferentes condições.

Termos-chave

Termos em negrito estão definidos no glossário.

ácido graxo 361	colesterol 372
ácido graxo poli-insaturado (AGPI) 362	prostaglandina (PG) 375
triacilglicerol 363	tromboxano (TX) 375
lipases 364	leucotrieno (LT) 376
fosfolipídeo 367	lipoxina (LX) 376
glicolipídeo 367	vitamina 376
glicerofosfolipídeo 367	vitamina D ₃ 377
lipídeo éter 368	colecalfiferol 377
plasmalogênio 368	vitamina A ₁ (todo- <i>trans</i> -retinol) 377
galactolipídeo 369	vitamina E 378
esfingolipídeo 369	tocoferol 378
ceramida 370	vitamina K 378
esfingomielina 370	dolicol 380
glicoesfingolipídeo 370	policetídeo 380
cerebrosídeo 370	lipidoma 384
globosídeo 370	
gangliosídeo 370	
esteroide 372	

Teste seu conhecimento

1. Definição operacional de lipídeos De que maneira a definição de “lipídeo” difere dos tipos de definição utilizados para outras biomoléculas, como os aminoácidos, os ácidos nucleicos e as proteínas?

2. Estrutura de um ácido graxo ômega 6 Desenhe a estrutura do ácido graxo ômega 6 16:1.

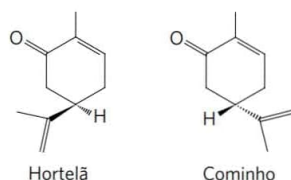
3. Pontos de fusão dos lipídeos Os pontos de fusão de uma série de ácidos graxos de 18 carbonos são: ácido esteárico, 69,6°C; ácido oleico, 13,4°C; ácido linoleico, -5°C; e ácido linolênico, -11°C.

- Que aspecto estrutural desses ácidos graxos de 18 carbonos pode ser correlacionado com o ponto de fusão?
- Desenhe todos os triacilgliceróis possíveis que podem ser construídos a partir de glicerol, ácido palmítico e ácido oleico. Classifique-os em ordem crescente de ponto de fusão.
- Ácidos graxos de cadeia ramificada são encontrados em alguns lipídeos de membrana bacterianos. A sua presença aumenta ou diminui a fluidez das membranas (i.e., diminui ou aumenta o seu ponto de fusão)? Por quê?

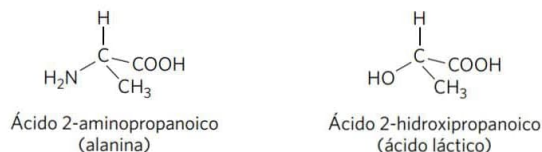
4. Hidrogenação catalítica dos óleos vegetais A hidrogenação catalítica, utilizada na indústria alimentícia, converte as ligações duplas nos ácidos graxos dos triacilgliceróis de óleos a $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$. Como isso afeta as propriedades físicas dos óleos?

5. Impermeabilidade das ceras Que propriedade das cutículas cerosas que recobrem as folhas das plantas deixa a cutícula impermeável à água?

6. Denominando os estereoisômeros de lipídeos Os dois compostos abaixo são estereoisômeros da carvona com propriedades bem diferentes; o da esquerda tem cheiro de hortelã e o da direita, de cominho. Denomine os compostos utilizando o sistema RS.



7. Designação RS para a alanina e o lactato Desenhe, utilizando a notação de fórmula em perspectiva, e indique os isômeros (*R*) e (*S*) do ácido 2-aminopropanoico (alanina) e do ácido 2-hidroxiopropanoico (ácido láctico).



8. Componentes hidrofóbicos e hidrofílicos dos lipídeos de membrana Uma característica estrutural comum dos lipídeos de membrana é a sua natureza anfipática. Por exemplo, na fosfatidilcolina, as duas cadeias de ácidos graxos são hidrofóbicas e o grupo cabeça polar, fosfocolina, é hidrofílico. Para cada um dos próximos lipídeos de membrana, denomine os componentes que servem como unidades hidrofóbica e hidro-

filica: (a) fosfatidiletanolamina; (b) esfingomielina; (c) galactosilcerebrosídeo; (d) gangliosídeo; (e) colesterol.

9. Deduzindo a estrutura lipídica a partir da composição A análise da composição de certo lipídeo mostra que ele tem exatamente um mol de ácido graxo por mol de fosfato inorgânico. Ele pode ser um glicerofosfolípídeo? Um gangliosídeo? Uma esfingomielina?

10. Deduzindo a estrutura do lipídeo a partir da proporção molar dos componentes A hidrólise completa de um glicerofosfolípídeo gera glicerol, dois ácidos graxos (16:1(Δ^9) e 16:0), ácido fosfórico e serina em proporção molar 1:1:1:1. Denomine esse lipídeo e desenhe sua estrutura.

11. Os lipídeos na determinação do grupo sanguíneo Foi visto, na Figura 10-14, que a estrutura dos glicoesfingolípídeos determina os grupos sanguíneos A, B e O em seres humanos. Também é verdade que as glicoproteínas determinam os grupos sanguíneos. Como podem ambas as afirmações serem verdadeiras?

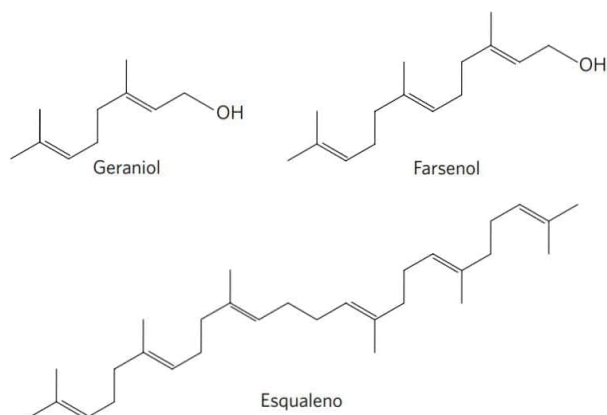


12. Ação das fosfolipases As peçonhas de uma espécie de cascavel (*Crotalus adamanteus*) e a da naja da Índia contêm fosfolipase A_2 , que catalisa a hidrólise de ácidos graxos na posição C-2 dos glicerofosfolípídeos. O produto da degradação do fosfolípídeo dessa reação é a lisolecitina (lecitina é a fosfatidilcolina). Em altas concentrações, esse e outros lisofosfolípídeos atuam como detergentes, dissolvendo as membranas dos eritrócitos e lisando as células. A hemólise em grandes proporções pode pôr a vida em risco.

- Todos os detergentes são anfipáticos. Quais são as porções hidrofílicas e hidrofóbicas da lisolecitina?
- A dor e a inflamação causadas pela picada de cobra podem ser tratadas com certos esteroides. Em que se fundamenta esse tratamento?
- Embora os altos níveis de fosfolipase A_2 na peçonha possam ser letais, essa enzima é necessária para vários processos metabólicos normais. Quais são eles?

13. Mensageiros intracelulares produzidos a partir dos fosfatidilinositóis Quando o hormônio vasopressina estimula a clivagem de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato pela fosfolipase C, dois produtos são formados. Quais são eles? Compare suas propriedades e suas solubilidades em água e considere se algum deles se difundiria facilmente no citosol.

14. Unidades de isopreno em isoprenoides O geraniol, o farnesol e o squaleno são chamados de isoprenoides porque são sintetizados a partir de unidades isopreno de cinco carbonos. Em cada composto, circule as unidades de cinco carbonos representando as unidades de isopreno (ver Figura 10-22).



15. Hidrólise de lipídeos Denomine os produtos da hidrólise branda com NaOH diluído do (a) 1-estearoil-2,3-dipalmitoil-glicerol; (b) 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina.

16. Efeito da polaridade na solubilidade Classifique as moléculas seguintes em ordem crescente de solubilidade em água: um triacilglicerol, um diacilglicerol e um monoacilglicerol, todos contendo apenas ácido palmítico.

17. Separação cromatográfica de lipídeos Uma mistura de lipídeos é aplicada a uma coluna de sílica gel, que é, então, lavada com solventes de polaridade crescente. A mistura consiste em fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, palmitato de colesterol (éster de esterol), esfingomielina, palmitato, *n*-tetradecanol, triacilglicerol e colesterol. Em que ordem os lipídeos eluirão da coluna? Explique o raciocínio utilizado.

18. Identificação de lipídeos desconhecidos Johann Thudichum, que exercia medicina em Londres cerca de 100 anos atrás, também se aventurava na química de lipídeos em seu tempo livre. Ele isolou uma variedade de lipídeos do tecido neural e caracterizou e identificou muitos deles. Seus frascos de lipídeos cuidadosamente selados e rotulados foram redescobertos muitos anos depois.

- (a) Como você confirmaria, usando técnicas não disponíveis para Thudichum, que os frascos identificados como “esfingomielina” e “cerebrosídeo” realmente continham esses compostos?
- (b) Como você distinguiria a esfingomielina da fosfatidilcolina por testes químicos, físicos ou enzimáticos?

19. Ninhidrina para detectar lipídeos em placas de cromatografia em camada delgada A ninhidrina reage especificamente com aminas primárias para formar um produto roxo-azulado. Um cromatograma em camada delgada de fosfolipídeos do fígado de rato é pulverizado com ninhidrina e deixa-se que a coloração se desenvolva. Quais fosfolipídeos podem ser detectados dessa forma?

Problema de análise de dados

20. Determinando a estrutura do lipídeo anormal na doença de Tay-Sachs A Figura Q-1 do Quadro 10-1 mostra a rota de degradação de gangliosídeos em indivíduos saudáveis (normais) e em indivíduos com certas doenças genéticas. Alguns dos dados nos quais a figura está baseada foram apresentados em um artigo de Lars Svennerholm (1962). Observe que o açúcar Neu5Ac, o ácido *N*-acetilneuramínico, representado na figura do Quadro 10-1 como ◆, é um ácido siálico.

Svennerholm relatou que “aproximadamente 90% dos monosialogangliosídeos isolados do cérebro de uma pessoa normal” consistiam em um composto com ceramida, hexose, *N*-acetilgalactosamina e ácido *N*-acetilneuramínico na proporção molar de 1:3:1:1.

- (a) Qual dos gangliosídeos (GM1 a GM3 e globosídeo) da Figura Q-1 do Quadro 10-1 se encaixa nessa descrição? Explique o raciocínio utilizado.

- (b) Svennerholm relatou que 90% dos gangliosídeos de um paciente com a doença de Tay-Sachs tinham uma proporção molar (dos mesmos quatro componentes dados anteriormente) de 1:2:1:1. Isso é consistente com a figura do Quadro 10-1? Explique o raciocínio utilizado.

Para determinar a estrutura mais detalhadamente, Svennerholm tratou os gangliosídeos com neuraminidase para remover o ácido *N*-acetilneuramínico. Isso resultou em um asialogangliosídeo que era muito mais fácil de analisar. Ele o hidrolisou com ácido, coletou os produtos que continham ceramida e determinou a proporção molar dos açúcares em cada produto. Ele fez isso tanto para os gangliosídeos de pessoas normais quanto para os daquelas com a doença de Tay-Sachs. Os seus resultados são mostrados abaixo.

Gangliosídeo	Ceramida	Glicose	Galactose	Galactosamina
<i>Normal</i>				
Fragmento 1	1	1	0	0
Fragmento 2	1	1	1	0
Fragmento 3	1	1	1	1
Fragmento 4	1	1	2	1
<i>Tay-Sachs</i>				
Fragmento 1	1	1	0	0
Fragmento 2	1	1	1	0
Fragmento 3	1	1	1	1

- (c) Com base nesses dados, o que você pode concluir sobre a estrutura do gangliosídeo normal? Isso é consistente com a estrutura no Quadro 10-1? Explique o raciocínio utilizado.
- (d) O que você pode concluir sobre a estrutura do gangliosídeo de Tay-Sachs? Isso é consistente com a estrutura no Quadro 10-1? Explique o raciocínio utilizado.

Svennerholm também relatou o trabalho de outros pesquisadores que “permetilaram” o asialogangliosídeo normal. Permetilação é o mesmo que uma metilação exhaustiva: grupos metila são adicionados a todos os grupos hidroxila de um açúcar. Eles encontraram os seguintes açúcares permetilados: 2,3,6-trimetilglicopirranose; 2,3,4,6-tetrametilgalactopirranose; 2,4,6-trimetilgalactopirranose; e 4,6-dimetil-2-desóxi-2-aminogalactopirranose.

- (e) A qual açúcar do GM1 corresponde cada um dos açúcares permetilados? Explique o raciocínio utilizado.
- (f) Com base em todos os dados apresentados até aqui, que informações sobre a estrutura do gangliosídeo normal estão faltando?

Referência

Svennerholm, L. 1962. The chemical structure of normal human brain and Tay-Sachs gangliosides. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 9:436–441.

Membranas biológicas e transporte

- 11.1 Composição e arquitetura das membranas 388**
11.2 Dinâmica da membrana 397
11.3 Transporte de solutos através da membrana 405

A primeira célula, provavelmente, passou a existir quando uma membrana se formou, envolvendo um pequeno volume de solução aquosa e separando-a do resto do universo. As membranas definem os limites externos das células e controlam o tráfego de moléculas por essa fronteira (**Figura 11-1**). Nas células eucarióticas, as membranas dividem o espaço interno em compartimentos que separam processos e componentes. Proteínas mergulhadas em membranas e proteínas associadas a membranas são responsáveis por sequências de reações fundamentais tanto para a conservação de energia como para a comunicação entre células. As atividades biológicas das membranas devem-se às suas propriedades físicas notáveis. As membranas são flexíveis, autosselantes e têm seletividade para permear solutos polares. A flexibilidade das membranas permite que as suas formas mudem e acompanhem o crescimento e o movimento da célula (como no movimento ameboide). Devido à capacidade de se romperem e se resselarem, duas membranas podem se fundir, como na exocitose, ou um compartimento envolvido por uma única membrana pode sofrer fissão e produzir dois compartimentos selados, como na endocitose ou na divisão celular, sem gerar grandes vazamentos através das superfícies celulares. Pelo fato de serem seletivamente permeáveis, as membranas retêm certos compostos e íons dentro das células e dentro de compartimentos celulares específicos e excluem outros.

As membranas não são barreiras meramente passivas. Elas incluem um arranjo de proteínas especializadas em propiciar ou catalisar vários processos celulares. Na superfície celular, transportadores movem solutos orgânicos e íons inorgânicos específicos de um lado a outro da membrana; receptores captam sinais extracelulares e disparam mudanças moleculares na célula; moléculas de adesão mantêm células vizinhas juntas. Dentro da célula, as membranas organizam processos celulares como a síntese de lipídeos e de certas proteínas, assim como a transdução de energia na mitocôndria e nos cloroplastos. Por serem formadas por apenas duas camadas de moléculas, as membranas são muito fi-

nas, de modo que são essencialmente bidimensionais. Como colisões envolvendo proteínas e lipídeos de membrana são muito mais prováveis nesse espaço bidimensional do que no espaço tridimensional, os processos catalisados por enzimas organizadas em membranas são ampliados enormemente.

Este capítulo inicia descrevendo a composição e a arquitetura química das membranas celulares – isto é, as estruturas moleculares que estão por trás das funções biológicas das membranas. A seguir, serão consideradas as características dinâmicas impressionantes das membranas, em que lipídeos e proteínas movem-se uns em relação aos outros. A adesão celular, a endocitose e a fusão de membrana que acompanham a secreção de neurotransmissores servem de exemplo do papel dinâmico das proteínas de membrana. Finalmente, a discussão focará na passagem de solutos mediada por proteínas através da membrana via transportadores e canais iônicos. Em capítulos seguintes, serão discutidos o papel das membranas na transdução de sinal (Capítulos 12 e 23), na transdução de energia (Capítulo 19), na síntese de lipídeos (Capítulo 21) e na síntese de proteínas (Capítulo 27).

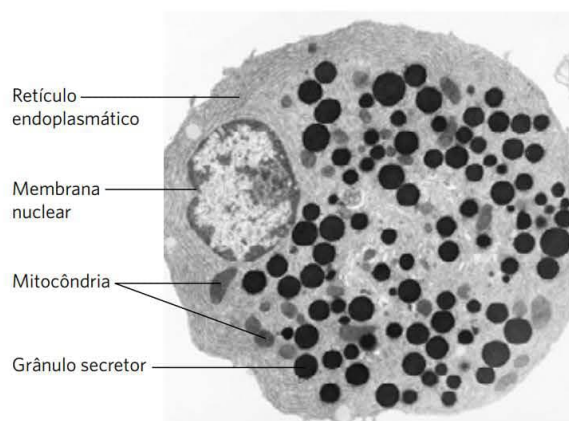


FIGURA 11-1 Membranas biológicas. Micrografia eletrônica de uma secção fina de célula do pâncreas exócrino, mostrando vários compartimentos formados ou ligados por membranas: retículo endoplasmático, núcleo, mitocôndria e grânulos secretores. [Fonte: Don W. Fawcett/ Science Source.]

11.1 Composição e arquitetura das membranas

Uma abordagem para se compreender a função da membrana é estudar a sua composição. Determinar, por exemplo, quais componentes são comuns a todas as membranas e quais são exclusivos de membranas com funções específicas. Assim, antes de descrever a estrutura e a função da membrana, cabe analisar os seus componentes moleculares: proteínas e lipídeos polares, que são responsáveis por quase toda a massa das membranas biológicas, e os carboidratos, presentes como parte de glicoproteínas e glicolipídeos.

Cada tipo de membrana tem proteínas e lipídeos característicos

A proporção relativa entre proteína e lipídeo varia de acordo com o tipo da membrana (Tabela 11-1), refletindo a diversidade das funções biológicas. Por exemplo, certas células formam uma bainha de mielina – uma extensão da membrana plasmática que se enrola ao redor dos axônios neuronais várias vezes e age como isolante elétrico passivo. A bainha de mielina consiste principalmente de lipídeos (bons isolantes), ao passo que as membranas plasmáticas de bactérias e membranas de mitocôndrias e cloroplastos, locais onde ocorrem muitos processos catalisados por enzimas, contêm mais proteínas do que lipídeos (em massa por massa total).

Para estudar a composição das membranas, a primeira tarefa é escolher e isolar uma membrana. Quando células eucarióticas são sujeitas à ruptura mecânica, as suas membranas plasmáticas rompem-se e fragmentam-se, liberando componentes citoplasmáticos e organelas ligadas a membranas, como mitocôndrias, cloroplastos, lisossomos e núcleos. Organelas intactas e fragmentos de membranas plasmáticas podem ser isolados com o uso das técnicas descritas no Capítulo 1 (ver Figura 1-9) e no Problema 2-1 (p. 57).

Claramente, as células têm mecanismos para controlar os tipos e as quantidades de lipídeos de membrana que elas sintetizam, bem como para direcionar lipídeos específicos a organelas particulares. Todos os reinos, todas as espécies, todos os tecidos ou tipos celulares e as organelas de cada

tipo celular têm um conjunto característico de lipídeos de membrana. As membranas plasmáticas, por exemplo, são ricas em colesterol e esfingolipídeos, mas não contêm cardiolipina em níveis detectáveis (Figura 11-2). As membranas das mitocôndrias são pobres em colesterol e esfingolipídeos, mas contêm a maior parte do fosfatidilglicerol e da cardiolipina das células, que são sintetizados na mitocôndria. Exceto em alguns poucos casos, o significado funcional dessas combinações ainda é desconhecido.

A composição proteica das membranas de diferentes origens varia muito mais do que a composição lipídica, um reflexo das funções especializadas que possuem. Além disso, algumas proteínas de membrana estão covalentemente ligadas a oligossacarídeos. Por exemplo, 60% da massa da glicoforina, glicoproteína da membrana plasmática do eritrócito, consiste em oligossacarídeos complexos covalentemente ligados a resíduos de aminoácidos específicos. Resíduos de Ser, Thr e Asn são os pontos de ligação mais comuns (ver Figura 7-30). As porções glicídicas das glicoproteínas da superfície celular influenciam os respectivos enovelamentos, a estabilidade, os destinos dentro da célula e a orientação na membrana, além de desempenharem um papel significativo na especificidade das moléculas que se ligam a receptores glicoproteicos da superfície (Figura 7-37).

Algumas proteínas de membrana são ligadas covalentemente a um ou mais lipídeos, que servem como âncoras hidrofóbicas para fixar as proteínas à membrana, o que será visto mais adiante.

Todas as membranas biológicas têm em comum algumas propriedades fundamentais

As membranas são impermeáveis para a maioria dos solutos polares ou carregados, mas são permeáveis a compostos apolares. As membranas têm uma espessura de 5 a 8 nm (50 a 80 Å), quando se inclui as protuberâncias das proteínas nos dois lados da membrana. Evidências fornecidas por microscopia eletrônica e estudos da composição química, assim como estudos físicos da permeabilidade e do movimento de moléculas proteicas e lipídicas individuais em membranas,

TABELA 11-1 Principais componentes das membranas plasmáticas de vários organismos

	Componentes (% em peso)			Tipo de esterol	Outros lipídeos
	Proteínas	Fosfolipídeo	Esterol		
Bainha de mielina humana	30	30	19	Colesterol	Galactolipídeos, plasmalogênio
Fígado de camundongo	45	27	25	Colesterol	—
Folha de milho	47	26	7	Sitosterol	Galactolipídeos
Leveduras	52	7	4	Ergosterol	Triacilgliceróis, ésteres de esterila
Paramécio (protista ciliado)	56	40	4	Estigmasterol	—
<i>E. coli</i>	75	25	0	—	—

Nota: os valores não chegam a 100% porque em muitos casos existem outros componentes além de proteínas, fosfolipídeos e esteróis. As plantas, por exemplo, têm um conteúdo de glicolipídeos alto.

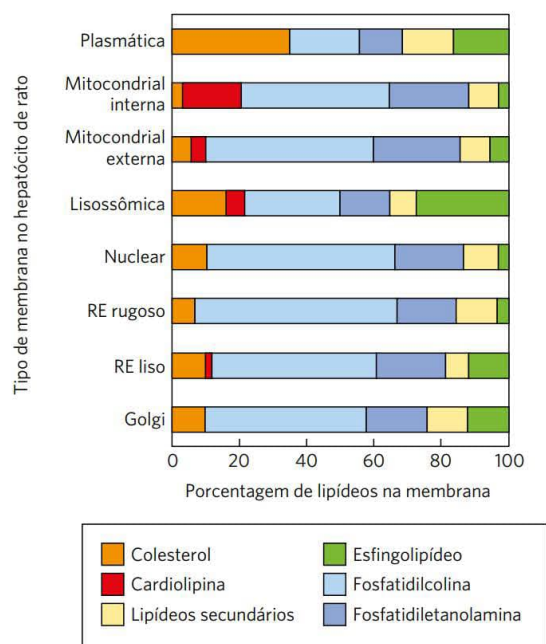


FIGURA 11-2 Composição lipídica da membrana plasmática e de membranas de organelas de hepatócito de rato. A especialização funcional de cada tipo de membrana é o reflexo de uma composição lipídica única. O colesterol está presente na membrana plasmática de maneira proeminente, mas raramente é detectável em membranas mitocondriais. A cardiolipina é o principal componente da membrana mitocondrial interna, mas não da membrana plasmática. A fosfatidilserina, o fosfatidilinositol e o fosfatidilglicerol são componentes relativamente secundários na maioria das membranas, porém exercem funções cruciais. O fosfatidilinositol e seus derivados, por exemplo, são importantes na transdução de sinais desencadeados por hormônios. Os esfingolípídeos, a fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina estão presentes na maioria das membranas, porém em proporções variáveis. Os glicolípídeos, que são os principais componentes das membranas dos cloroplastos de plantas, são praticamente ausentes nas células animais.

levaram ao desenvolvimento do **modelo do mosaico fluido** para explicar a estrutura das membranas biológicas (**Figura 11-3**). Os fosfolípídeos formam uma bicamada, na qual as regiões apolares das moléculas lipídicas em cada camada são orientadas para o centro da bicamada e os grupos polares são orientados para fora, interagindo com a fase aquosa de cada lado da membrana. As proteínas estão mergulhadas nesta folha em bicamada com os domínios hidrofóbicos em contato com as cadeias de ácidos graxos dos lipídeos de membrana. Algumas proteínas se projetam para fora apenas de um dos lados da membrana, ao passo que outras expõem domínios em ambos os lados. A orientação das proteínas na bicamada é assimétrica, conferindo à membrana uma assimetria: os domínios proteicos expostos em um lado da membrana são diferentes daqueles expostos do outro lado, refletindo uma assimetria nas funções. As unidades lipídicas e proteicas individuais da membrana formam um mosaico fluido com um padrão que, ao contrário de um mosaico de ladrilhos de cerâmica acimentados, é livre para se alterar constantemente. O mosaico da membrana é fluido porque a maioria das

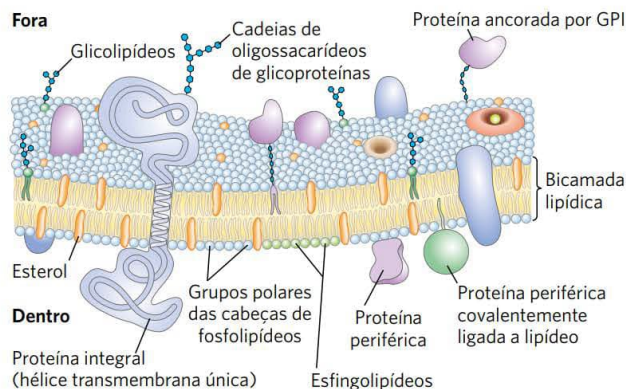


FIGURA 11-3 Modelo do mosaico fluido para a estrutura da membrana plasmática. As cadeias acila no interior da membrana formam uma região hidrofóbica fluida. As proteínas integrais flutuam nesse mar de lipídeos, mantidas por interações hidrofóbicas com as cadeias laterais de resíduos de aminoácidos apolares. Tanto as proteínas quanto os lipídeos são livres para se moverem lateralmente no plano da bicamada, mas o movimento de um lado ao outro da bicamada é restrito. As porções de carboidrato ligadas a algumas proteínas e a lipídeos da membrana plasmática ficam expostas na superfície extracelular.

interações entre os componentes é não covalente e as moléculas proteicas e lipídicas ficam livres para se movimentar lateralmente no plano da membrana.

A seguir, algumas dessas características da estrutura das membranas serão vistas em mais detalhes, assim como as evidências experimentais que dão suporte para o modelo.

A bicamada lipídica é o elemento estrutural básico das membranas

Os glicerofosfolípídeos, os esfingolípídeos e os esteróis são praticamente insolúveis em água. Quando misturados com água, eles espontaneamente formam agregados lipídicos microscópicos, agrupando-se de modo a manter as porções hidrofóbicas em contato entre si e com os grupos hidrofílicos interagindo com a água circundante. Esse agrupamento reduz a superfície hidrofóbica exposta à água e, assim, minimiza o número de moléculas da camada de água ordenada que participam na interface lipídeo-água (ver Figura 2-7), resultando em aumento de entropia. É esse efeito hidrofóbico que fornece a força termodinâmica que impulsiona a formação e a manutenção desses agrupamentos de moléculas lipídicas. Embora o termo **interação hidrofóbica**, algumas vezes, seja usado para descrever o agrupamento de superfícies moleculares hidrofóbicas na superfície de ambientes aquosos, deve ficar bem claro que não há interação química alguma entre essas moléculas. Elas, simplesmente, encontram um ambiente com o estado de menor energia, diminuindo a superfície hidrofóbica, ou não polar, exposta à água.

Dependendo das condições exatas e da natureza dos lipídeos, três tipos de agregados de lipídeos podem ser formados quando lipídeos anfipáticos são misturados com água (**Figura 11-4**). As **micelas** são estruturas esféricas que contêm desde poucas dúzias até alguns poucos milhares de moléculas anfipáticas. Essas moléculas dispõem-se com as

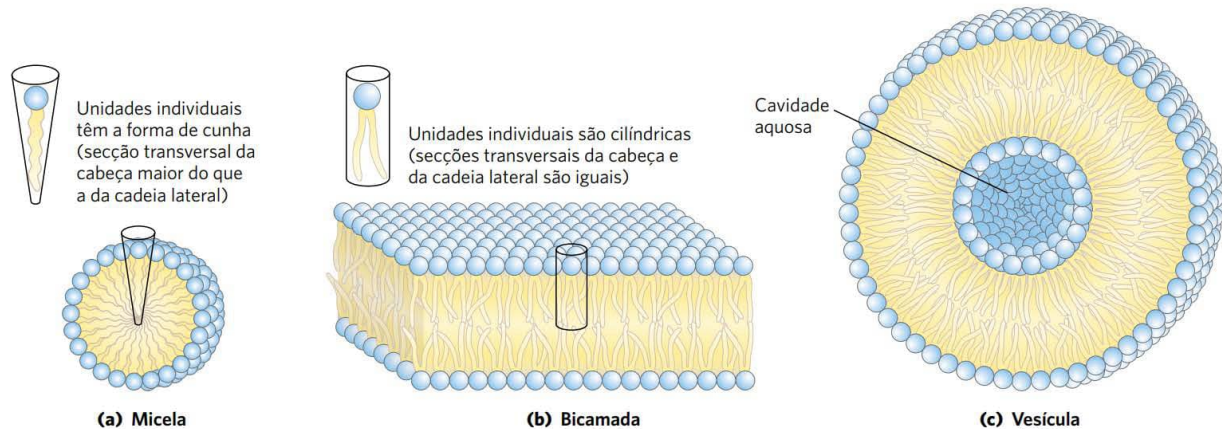


FIGURA 11-4 Agregados lipídicos anfipáticos formados na água. (a) Nas micelas, as cadeias hidrofóbicas dos ácidos graxos são sequestradas no núcleo da esfera. Praticamente não há água no interior hidrofóbico. (b) Em uma bicamada aberta, todas as cadeias laterais acila, exceto aquelas das margens da lâmina, estão protegidas da interação com a água. (c) Quando a bicamada bidimensional se dobra sobre ela mesma, ela forma uma bicamada fechada, uma vesícula oca tridimensional (lipossomo) que envolve uma cavidade aquosa.

suas regiões hidrofóbicas agregadas na parte interna, expulsando, assim, a água, e com os seus grupos polares hidrofílicos na superfície, em contato com a água. A formação de micelas é favorecida quando a área de seção transversal do grupo polar é maior do que a da(s) cadeia(s) lateral(is) acila, como nos ácidos graxos, lisofosfolípeos (fosfolípeos com um ácido graxo a menos) e detergentes, como o dodecil sulfato de sódio (SDS; p. 94).

Um segundo tipo de agregado lipídico na água é a **bicamada**, na qual duas camadas monolípídicas formam uma lâmina bidimensional. A formação da bicamada é favorecida quando as áreas de seção transversal dos grupos polares e as cadeias acila laterais são semelhantes, como no caso dos glicerosfosfolípeos e dos esfingolípídeos. As porções hidrofóbicas em cada monocamada, excluídas da água, interagem entre si. Os grupos hidrofílicos da cabeça polar interagem com a água em uma das superfícies da bicamada. Como as regiões hidrofóbicas das extremidades (Figura 11-4b) ficariam em contato com a água, a lâmina da bicamada é relativamente instável e, por isso, fecha-se sobre si mesma, formando uma esfera oca, denominada **vesícula** ou lipossomo (Figura 11-4c). A superfície contínua das vesículas evita que regiões hidrofóbicas fiquem expostas ao ambiente aquoso, o que faz as bicamadas alcançarem o máximo de estabilidade quando em meio aquoso. A formação da vesícula também cria um compartimento interno separado (o lúmen da vesícula). É provável que os precursores das primeiras células vivas tenham apresentado semelhanças com as vesículas lipídicas, com o conteúdo aquoso separado do meio circundante por uma casca hidrofóbica.

A bicamada lipídica tem 3 nm (30 Å) de espessura. O cerne hidrocarbonado, composto por $-\text{CH}_2-$ e $-\text{CH}_3$ dos grupos acila, é tão apolar quanto o decano, e vesículas formadas em laboratório a partir de lipídeos puros (lipossomos) são essencialmente impermeáveis a solutos polares, do mesmo modo que a bicamada lipídica das membranas biológicas (embora as membranas biológicas, como será visto, sejam permeáveis a solutos para os quais possuam transportadores específicos).

A maior parte dos lipídeos e das proteínas de membrana é sintetizada no retículo endoplasmático (RE) e daí vão para as organelas de destino ou para a membrana plasmática (Figura 11-5a). Durante este “tráfego pela membrana”, pequenas vesículas de membrana brotam do RE e vão para o *cis* Golgi e se fundem com ele. À medida que lipídeos e proteínas se movimentam pelo Golgi, dirigindo-se para o lado *trans*, elas sofrem um grande número de alterações covalentes que determinam onde vão se localizar e quais as funções que terão na célula. Por exemplo, as cadeias oligossacarídicas ou as cadeias de ácidos graxos, como o palmitato, estão ligadas covalentemente a proteínas de membrana específicas, e os fosfolípeos sofrem uma reorganização dos ácidos graxos que os compõem até atingirem suas formas maduras. Em muitos casos, essas modificações determinam a futura localização das proteínas modificadas. Esse tráfego pelas membranas é acompanhado por mudanças impressionantes na composição e na disposição dos lipídeos na bicamada (Figura 11-5b). O principal fosfolípídeo da face voltada para o lúmen da membrana do Golgi é a fosfatidilcolina. Entretanto, no transporte de vesículas que deixam o *trans* Golgi, a fosfatidilcolina é, em grande parte, substituída por esfingolípídeos e colesterol, os quais, após a fusão das vesículas de transporte com a membrana plasmática, formam a maior parte da monocamada externa da membrana celular. Os lipídeos da membrana plasmática estão distribuídos de forma assimétrica entre as duas monocamadas da bicamada. Na membrana plasmática das células eucarióticas, por exemplo, lipídeos contendo colina (fosfatidilcolina e esfingomielina) são encontrados na camada externa (extracelular ou exoplasmática), ao passo que fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilinositol são encontrados quase que exclusivamente na face interna (citoplasmática), onde os grupos com carga negativa da serina e do inositolfosfato podem interagir eletrostaticamente com as regiões de carga positiva de proteínas periféricas ou anfitrópicas da membrana (descritas a seguir). Uma segunda via de redistribuição de lipídeos dos locais de onde são sintetizados para a membrana de destino é por canais media-

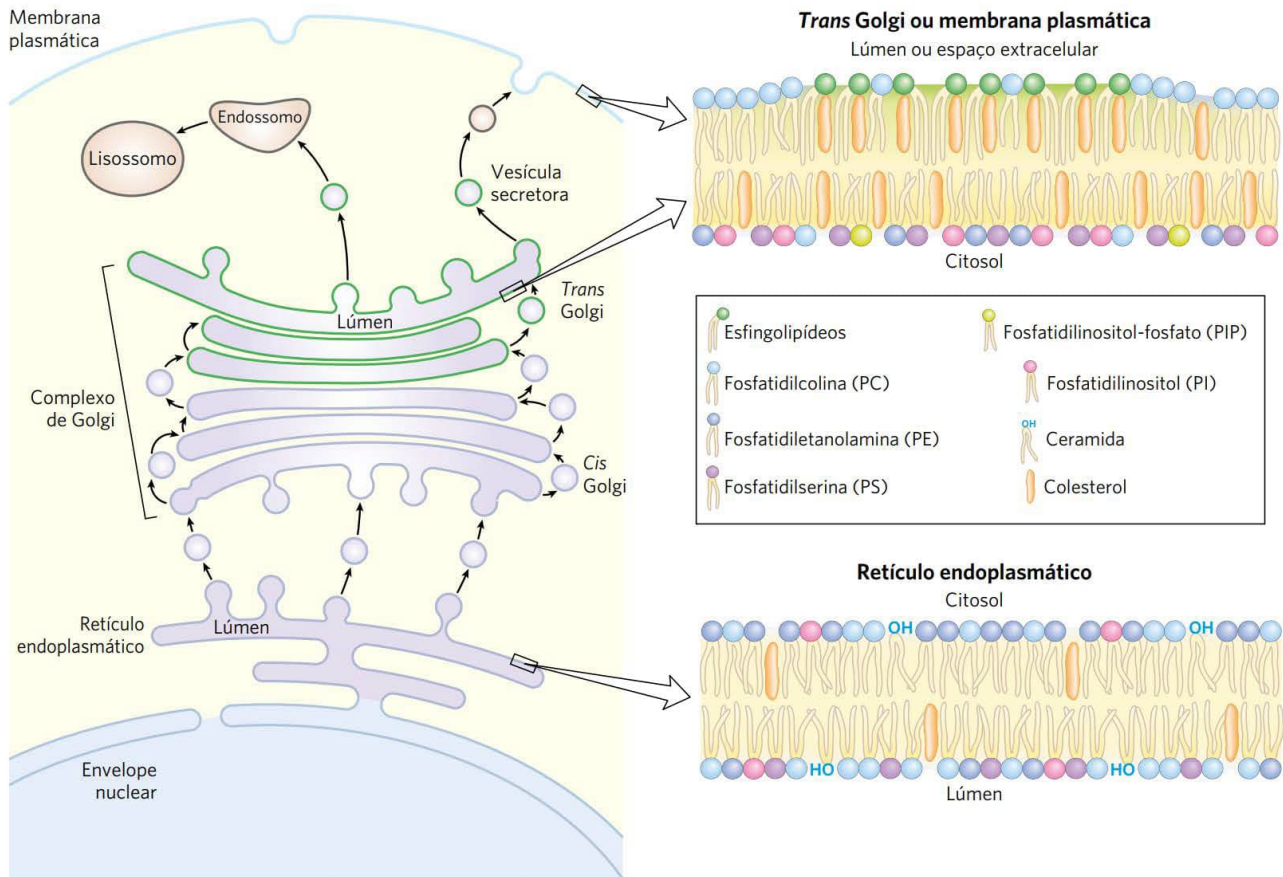


FIGURA 11-5 Mudanças na composição acompanham o tráfego de membranas. (a) O caminho dos lipídeos e das proteínas durante o tráfego de membranas entre os locais de síntese (RE) através do complexo de Golgi até a superfície da célula (ou de organelas, como os lisossomos). Pequenas vesículas brotam do RE e movem-se até se fundirem com o *cis* Golgi, deixam o *trans* Golgi como vesículas de secreção ou de transporte e se fundem com a membrana plasmática ou com os endossomos, os quais dão origem aos lisossomos. (b) Durante o tráfego, tanto a composição de lipídeos da bicamada quanto à distribuição de lipídeos específicos entre as faces interna e externa da membrana se alteram drasticamente. [Fonte: (b) informações de G. Drin, *Annu. Rev. Biochem.* 83:51, 2014, Fig. 1.]

dos por proteínas especializadas, denominados junções, incluindo junções entre RE e membrana plasmática e junções entre RE e mitocôndria.

Um dos primeiros métodos para determinar a distribuição de fosfolipídeos específicos na bicamada da membrana plasmática foi tratar células inteiras com fosfolipase C, que não é capaz de chegar aos lipídeos da monocamada interna (lâmina interna), mas remove os grupos das cabeças dos lipídeos da monocamada externa. As proporções entre cada grupo liberado dão uma estimativa da proporção de cada lipídeo que está presente na monocamada externa da membrana plasmática. Atualmente, a localização de lipídeos individuais na membrana plasmática ou em outras membranas das células pode ser determinada com grande resolução por meio do uso de métodos que aplicam análogos fluorescentes de lipídeos ou derivados fluorescentes de anticorpos, toxinas ou domínios que tenham grande afinidade e especificidade para um determinado tipo de lipídeo. A localização de onde os marcadores fluorescentes se ligam é determinada por microscopia de fluorescência de alta resolução.

Mudanças da distribuição de lipídeos ao longo do tempo entre as monocamadas (lâmina) da membrana plasmática levam a consequências biológicas. Por exemplo, as plaquetas do sangue só têm capacidade de desempenhar seus papéis na formação do coágulo sanguíneo quando a fosfatidilserina da membrana plasmática passa para a monocamada externa. No caso de vários outros tipos de células, a exposição de fosfatidilserina na monocamada externa marca a célula para destruição por morte celular programada. O movimento de moléculas de fosfolipídeos de uma monocamada para a outra é catalisado por um grupo específico de enzimas que sofrem regulação.

Três tipos de proteínas de membrana se diferenciam de acordo com a natureza da associação com a membrana

Proteínas integrais da membrana estão mergulhadas na bicamada lipídica e podem ser removidas apenas por agentes que se sobreponham ao efeito hidrofóbico, como detergentes, solventes orgânicos ou desnaturantes (**Figura 11-6**). Proteínas integrais podem ser **monotópicas**, interagem com

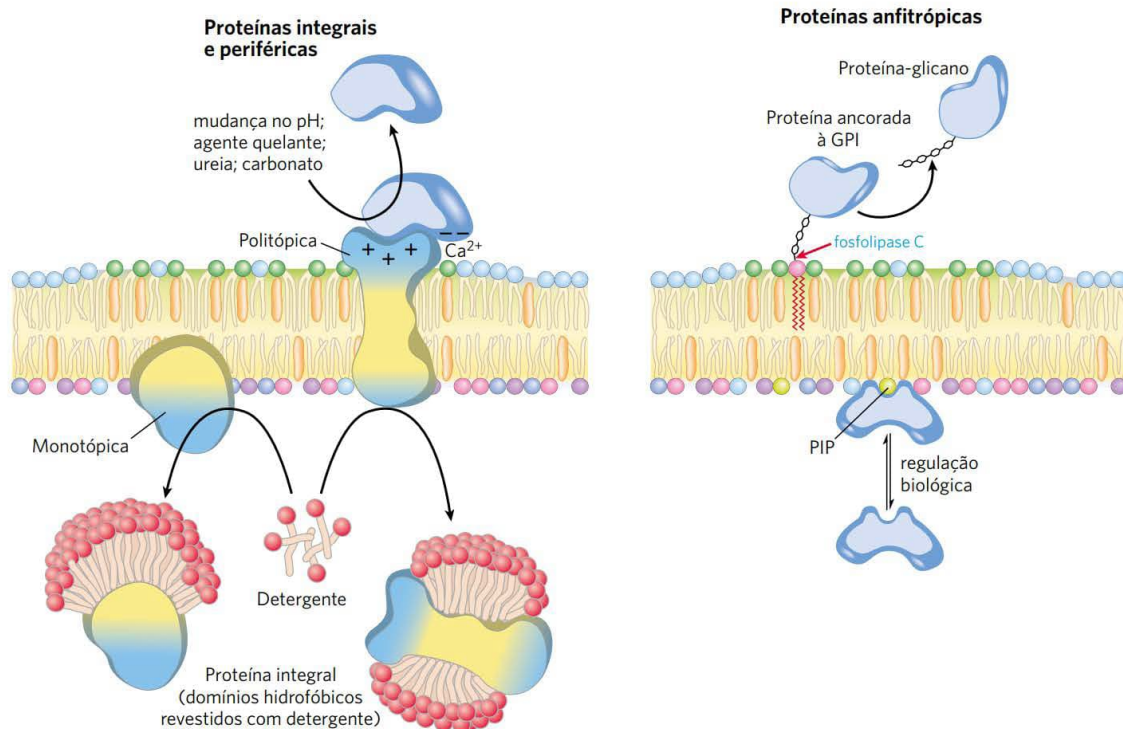


FIGURA 11-6 Proteínas integrais, periféricas e anfitrópicas. As proteínas de membrana podem ser diferenciadas operacionalmente pelas condições necessárias para liberá-las da membrana. As proteínas integrais, tanto monotrópicas (associadas a uma das lâminas da membrana) quanto politrópicas (transmembrana) podem ser extraídas com detergentes, que destroem as interações hidrofóbicas da bicamada lipídica e formam aglomerados do tipo micela ao redor das moléculas individuais de proteínas. As proteínas anfitrópicas ligadas covalentemente a lipídeos de membrana, como o glicosilfosfatidilinositol (GPI; ver Figura 11-13), podem ser liberadas por tratamento com fosfolipase C. A maioria das proteínas periféricas podem ser liberadas por mudanças no pH ou na força iônica, remoção de Ca^{2+} por um agente quelante ou pela adição de ureia ou carbonato. As proteínas anfitrópicas algumas vezes estão associadas com membranas e outras vezes não, dependendo de algum tipo de processo regulatório como, por exemplo, palmitoilação.

apenas uma das lâminas da membrana, ou **politépicas**, possuem uma cadeia polipeptídica que atravessa a membrana uma ou mais vezes. As **proteínas periféricas de membrana** associam-se com a membrana por meio de interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio com regiões hidrofílicas de proteínas integrais e de lipídeos da membrana. No laboratório, a associação dessas proteínas com a membrana pode ser desfeita por meio de tratamentos suaves que interfiram com as interações eletrostáticas ou que quebrem as ligações de hidrogênio. Em geral, o agente utilizado é carbonato em pH elevado. As **proteínas anfitrópicas** associam-se reversivelmente com membranas e, portando, podem ser encontradas tanto na membrana quanto no citosol. Suas afinidades pelas membranas resultam, em alguns casos, das interações não covalentes dessas proteínas com uma proteína ou lipídeo de membrana e, em outros casos, da presença de um ou mais lipídeos covalentemente ligados à proteína anfitrópica (ver Figura 11-13). Normalmente, a associação reversível das proteínas anfitrópicas com a membrana é regulada. Por exemplo, a fosforilação ou a ligação de um ligante pode forçar uma mudança conformacional na proteína, expondo o sítio de ligação da membrana inacessível anteriormente. A ligação covalente de uma ou mais porções lipídicas também pode afetar a afinidade de uma proteína anfitrópica pela membrana.

Muitas proteínas integrais de membrana atravessam a bicamada lipídica

A topologia das proteínas de membrana (localização dos domínios de uma proteína em relação à bicamada lipídica) pode ser determinada por meio do uso de reagentes que reagem com as cadeias laterais das proteínas, mas não são capazes de atravessar a membrana – reagentes químicos polares que reagem com a amina primária de resíduos de Lys, por exemplo, ou enzimas como a tripsina que clivam proteínas de membrana, mas não atravessam a membrana. Se a proteína de membrana de um eritrócito intacto reagir com um composto impermeável à membrana, essa proteína deve ter no mínimo um domínio exposto na face externa (extracelular) da membrana. Por exemplo, a tripsina cliva domínios extracelulares, mas não afeta domínios escondidos na bicamada lipídica ou expostos apenas na face interna, a menos que a membrana seja rompida de modo que esses domínios fiquem acessíveis para a enzima.

Experimentos com reagentes específicos para análise da topologia mostram que a glicoproteína de eritrócito **glicoforina** atravessa a membrana plasmática. O domínio aminoterminal (contendo as cadeias de carboidratos) está na superfície externa e é clivado pela tripsina. A extremidade carboxiterminal projeta-se para o interior da célula, onde não pode reagir com reagentes impermeáveis. Tanto o domí-

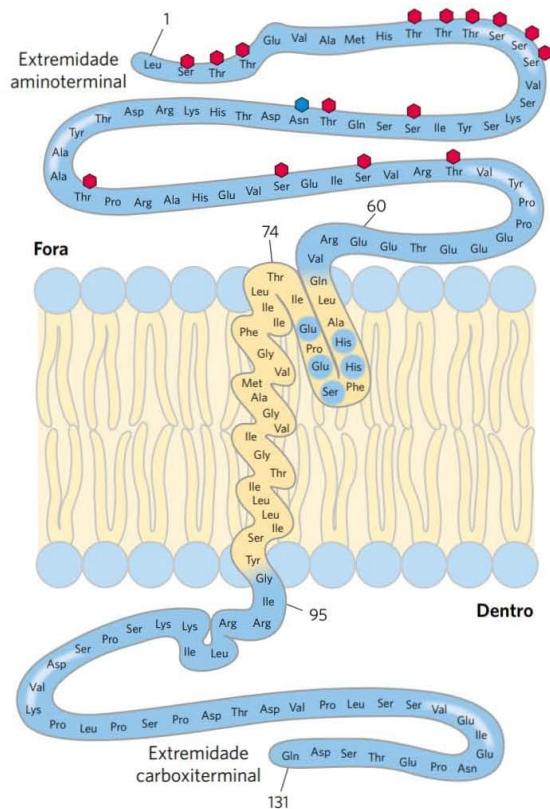


FIGURA 11-7 Disposição transbicamada da glicoforina nos eritrócitos. Um domínio hidrofílico contendo todos os resíduos de açúcar encontra-se na superfície externa da membrana e outro domínio hidrofílico projeta-se da face interna da membrana. Cada hexágono vermelho representa um tetrassacarídeo (contendo dois Neu5Ac [ácido siálico], Gal e GalNAc) O-ligado a um resíduo de Ser ou Thr; o hexágono azul representa um oligossacarídeo N-ligado a um resíduo de Asn. O tamanho relativo das unidades de oligossacarídeos é maior do que o que está mostrado aqui. Um segmento de 19 resíduos hidrofóbicos (resíduos 75 a 93) forma uma α -hélice que atravessa a bicamada da membrana (ver Figura 11-10a). O segmento formado pelos resíduos 64 a 74 tem alguns resíduos hidrofóbicos e, provavelmente, penetra a face externa da bicamada lipídica, como mostrado. [Fonte: informações de V.T. Marchesi et al., *Annu. Rev. Biochem.* 45:667, 1976.]

nio aminoterminal quanto o carboxiterminal possuem muitos resíduos de aminoácidos polares ou carregados e são, portanto, hidrofílicos. Entretanto, um segmento no centro da proteína (resíduos 75 a 93) contém muitos resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, indicando que a glicoforina tem um segmento transmembrana disposto conforme mostrado na **Figura 11-7**. Estudos físicos e químicos rigorosos confirmaram que a glicoforina tem essa topologia e estabeleceram a topologia de muitas outras proteínas de membrana.

Esses estudos topológicos também revelaram que a orientação da glicoforina na membrana é assimétrica: o segmento aminoterminal *sempre* fica do lado de fora. Estudos semelhantes com muitas outras proteínas integrais de membrana mostram que cada uma delas tem uma orientação na bicamada e que os dois lados da membrana são diferentes entre si. Para a glicoforina e para todas as outras glicoproteínas da membrana plasmática, os domínios glicosilados ficam situados invariavelmente na face extracelular da bi-

camada. Como será visto mais adiante, o arranjo assimétrico das proteínas de membrana determina uma assimetria funcional. Todas as moléculas de uma determinada bomba iônica, por exemplo, têm a mesma orientação na membrana e bombeiam íons na mesma direção.

Regiões hidrofóbicas de proteínas integrais associam-se com os lipídeos da membrana

A ligação de proteínas integrais à membrana deve-se ao efeito hidrofóbico; o movimento dos domínios hidrofílicos das proteínas para abandonar o contato com os lipídeos e passar a fazer contato com o ambiente aquoso tem um alto custo termodinâmico. Algumas proteínas politópicas têm uma única sequência hidrofóbica no meio da molécula (como no caso da glicoforina) ou na extremidade carboxiterminal. Outras têm várias sequências hidrofóbicas, cada uma delas, quando em conformação de α -hélice, tem um comprimento suficiente (cerca de 20 resíduos) para atravessar a bicamada lipídica. (Lembre-se, do Exemplo 4-1, que cada resíduo da α -hélice aumenta o comprimento da hélice em 1,5 Å.)

Uma das proteínas politópicas mais bem estudadas, a bacteriorrodopsina, tem sete segmentos internos de sequências muito hidrofóbicas e atravessa a membrana sete vezes. A bacteriorrodopsina é uma bomba de prótons acionada pela luz, densamente compactada em arranjos regulares na membrana da bactéria roxa *Halobacterium salinarum*. A cristalografia por raios X revela uma estrutura com sete segmentos α -helicoidais, cada um deles atravessando a bicamada lipídica, conectados por alças não helicoidais nas faces interna e externa da membrana (**Figura 11-8**). Na sequência de aminoácidos da bacteriorrodopsina, podem ser identificados sete segmentos com aproximadamente 20 resíduos hidrofóbicos, cada um deles formando uma α -hélice que atravessa

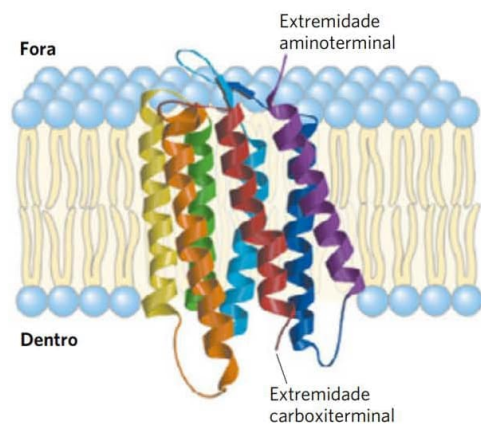


FIGURA 11-8 Bacteriorrodopsina, uma proteína que atravessa a membrana. Uma única cadeia polipeptídica enovela-se, formando sete α -hélices hidrofóbicas, cada uma delas atravessando a membrana lipídica de maneira mais ou menos perpendicular ao plano da membrana. As sete hélices transmembrana ficam agrupadas, e o espaço ao redor e entre elas é preenchido com cadeias acila dos lipídeos de membrana. O pigmento retinal, que absorve a luz (ver Figura 10-20), está profundamente inserido na membrana em contato com vários segmentos helicoidais (não mostrado). As cores das hélices correspondem às do diagrama de hidropatia apresentado na Figura 11-12b. [Fonte: PDB ID 2AT9, K. Mitsuoka et al., *J. Mol. Biol.* 286:861, 1999.]

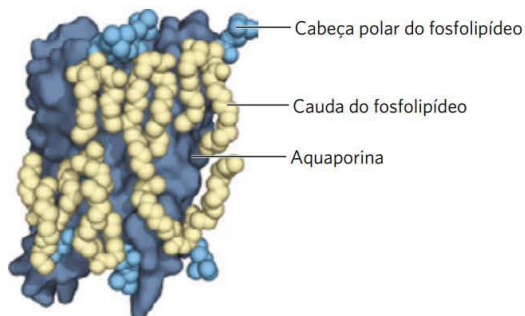


FIGURA 11-9 Anel lipídico associado com uma proteína integral de membrana. (a) A estrutura cristalina da aquaporina de ovelha, um canal aquoso transmembrana, inclui uma camada de fosfolípidos posicionados com os grupos polares (em azul) nas posições esperadas nas superfícies interna e externa da membrana e as cadeias acila hidrofóbicas (em dourado) associadas intimamente com a superfície da proteína exposta à bicamada. O lipídeo forma um “selante oleoso” ao redor da proteína, que é ilustrado representado com uma superfície azul-escura. [Fonte: PDB ID 2B6O, T. Gonen et al., *Nature* 438:633, 2005.]

a bicamada. As sete hélices estão aglomeradas e orientadas de modo não bem perpendicular ao plano da bicamada, um padrão que (conforme será visto no Capítulo 12) é um motivo comum em proteínas de membrana envolvidas com recepção de sinal. O efeito hidrofóbico mantém os resíduos de aminoácidos não polares ancorados firmemente nos grupos dos ácidos graxos dos lipídeos da membrana.

Quando as respectivas estruturas foram resolvidas por cristalografia, ficou claro que muitas proteínas de membrana possuem moléculas de fosfolípidos ligadas e supõe-se que elas estejam posicionadas na membrana nativa da mesma maneira que nos cristais de proteína. Muitas dessas moléculas de fosfolípidos se encontram na superfície das proteínas, com os grupos polares interagindo com resíduos de aminoácidos polares entre as membranas interna e externa-interfaces com a água, e suas caudas apolares associadas com resíduos apolares. Esses **lipídeos anelares** formam uma bicamada em forma de concha (ou de anel) ao redor da proteína, estando orientados de forma parecida ao esperado para os fosfolípidos em uma bicamada (**Figura 11-9**). Outros fosfolípidos são encontrados nas interfaces entre monômeros de proteínas de membrana de várias subunidades, onde eles formam um “selante oleoso”. Outros, ainda, estão inseridos no interior de uma proteína de membrana, geralmente com os grupos polares bem abaixo do plano da bicamada. Por exemplo, a citocromo-oxidase (complexo IV, encontrado na mitocôndria) tem 13 moléculas de lipídeos visíveis na estrutura do cristal: duas cardiolipinas, uma fosfatidilcolina, três fosfatidiletanolaminas, quatro prostaglandinas e três triacilgliceróis, cada uma delas ligada a um sítio específico na oxidase. Alguns dos sítios são internos, mas a maioria das 13 moléculas de lipídeos está localizada e orientada na bicamada lipídica.

A topologia de uma proteína integral de membrana pode, algumas vezes, ser prevista a partir da sequência de aminoácidos da proteína

Em geral, é muito mais difícil determinar a estrutura tridimensional de uma proteína de membrana – isto é, a sua topologia – do que determinar a sequência de aminoácidos, tanto

diretamente quanto por sequenciamento do gene. As sequências de aminoácidos de milhares de proteínas de membrana são conhecidas e relativamente poucas estruturas tridimensionais foram estabelecidas por cristalografia ou espectroscopia por RMN. A presença de sequências intactas com mais de 20 resíduos hidrofóbicos em uma proteína de membrana, em geral, é tida como evidência de que essas sequências atravessam a bicamada lipídica, atuando como âncoras hidrofóbicas ou formando um canal transmembrana. Praticamente todas as proteínas integrais têm pelo menos uma sequência desse tipo. A aplicação dessa lógica a sequências genômicas inteiras leva à conclusão de que, em muitas espécies, de 20 a 30% de todas as proteínas são proteínas integrais de membrana.

O que é possível prever sobre a estrutura secundária das porções da proteína integral que atravessam a membrana? Com 1,5 Å (0,15 nm) de comprimento por resíduo de aminoácido, uma α -hélice de 20 a 25 resíduos tem o comprimento exato para atravessar a bicamada lipídica (30 Å). Uma cadeia polipeptídica rodeada por lipídeos, sem moléculas de água às quais possa se ligar por ligações de hidrogênio, tende a formar α -hélices ou folhas β , nas quais as ligações de hidrogênio intracadeia são maximizadas. Se as cadeias laterais de todos os aminoácidos da hélice forem apolares, a hélice fica ainda mais estável entre os lipídeos das redondezas devido ao efeito hidrofóbico.

Vários métodos simples de análise de sequência de DNA permitem previsões razoavelmente precisas quanto à estrutura secundária de proteínas transmembrana. A polaridade relativa de cada aminoácido é determinada experimentalmente pela medida da variação de energia livre que acompanha a transferência da cadeia lateral do aminoácido de um solvente hidrofóbico para a água. Essa energia livre de transferência, que pode ser expressa como **índice de hidropatia** (ver Tabela 3-1), varia desde muito exergônica para resíduos carregados ou polares até muito endergônica para aminoácidos com cadeias laterais de hidrocarbonetos aromáticos ou alifáticos. O índice de hidropatia geral (hidrofobicidade) de uma sequência de aminoácidos é estimado pela soma das energias livres de transferência dos resíduos presentes na sequência. Para examinar a sequência de um polipeptídeo para segmentos potenciais que atravessam a membrana, os pesquisadores calculam o índice de hidropatia para segmentos sucessivos (chamados de janelas) de um determinado tamanho, de 7 a 20 resíduos. Para uma janela de sete resíduos, por exemplo, os índices médios para os resíduos 1 a 7, 2 a 8, 3 a 9, e assim por diante, estão representados como na **Figura 11-10** (representado para o resíduo do meio em cada janela – p. ex., resíduo 4 para resíduos de 1 a 7). Supõe-se que uma região com mais de 20 resíduos com alto índice de hidropatia seja um segmento transmembrana. Quando sequências de proteínas transmembrana com estruturas tridimensionais já conhecidas são examinadas usando ferramentas simples de bioinformática disponíveis *online*, verifica-se que há uma correspondência razoavelmente boa entre a predição e elementos que atravessam a membrana já conhecidos. A análise de hidropatia prediz que a glicoforina (**Figura 11-10a**) tem uma única hélice hidrofóbica e a bacteriorrodopsina (**Figura 11-10b**) tem sete segmentos transmembrana, o que concorda com as estruturas determinadas por cristalografia por raios X.

Nem todas as proteínas integrais de membrana são formadas por α -hélices transmembrana. Outro motivo estru-

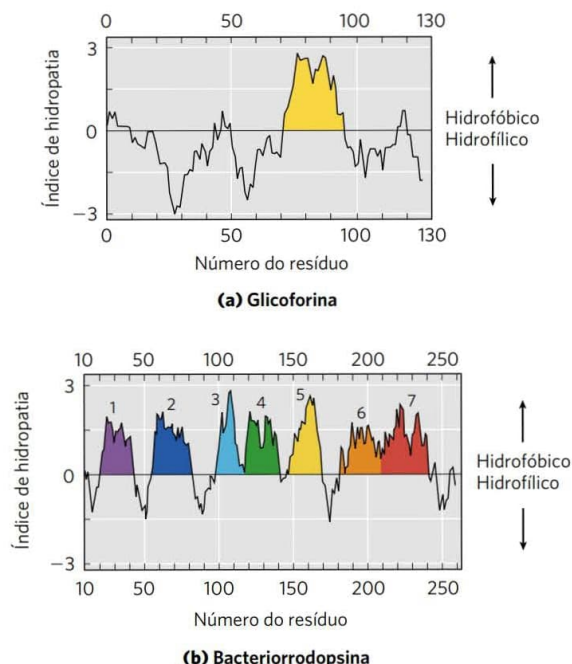


FIGURA 11-10 Gráfico de hidropatia. O índice de hidropatia médio (ver Tabela 3-1) está representado em relação ao número do resíduo para duas proteínas integrais de membrana. O índice de hidropatia para cada resíduo de aminoácido em uma sequência de comprimento definido, ou “janela”, é usado para calcular a hidropatia média para aquela janela. O eixo horizontal mostra o número do resíduo no meio da janela. **(a)** A glicoforina de eritrócito humano tem uma única sequência hidrofóbica entre os resíduos 75 e 93 (em amarelo); comparar com a Figura 11-7. **(b)** A bacteriorrodopsina tem sete regiões hidrofóbicas, e estudos físicos independentes mostraram que ela tem sete hélices transmembrana (ver Figura 11-8). Observe, entretanto, que o gráfico de hidropatia é ambíguo na região dos segmentos 6 e 7. A cristalografia por raios X confirmou que essa região tem dois segmentos transmembrana.

tural comum em proteínas de membrana de bactérias é o **barril β** (ver Figura 4-18b), no qual 20 ou mais segmentos transmembrana formam folhas β que se alinham como um cilindro (**Figura 11-11**). Os mesmos fatores que favorecem

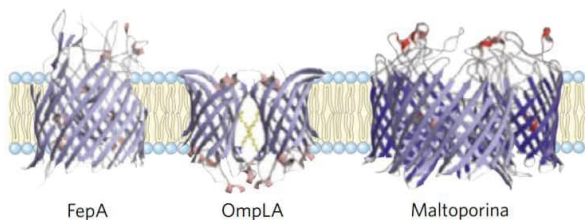


FIGURA 11-11 Proteínas de membrana com estruturas em barril β . Estão mostradas três proteínas da membrana externa da bactéria *E. coli*, vistas no plano da membrana. A proteína FepA, envolvida na captação de ferro, tem 22 segmentos de fita β atravessando a membrana. A fosfolipase A da membrana externa, ou OmpLA, tem 12 segmentos em barril β que existem na membrana como um dímero. A maltoporina, um transportador de maltose, é um trímero, com cada monômero formado por 16 fitas β . [Fontes: FepA: PDB ID 1FEP, S. K. Buchanan et al., *Nature Struct. Biol.* 6:56, 1999. OmpLA: modificada a partir de PDB ID 1QD5, H. J. Snijder et al., *Nature* 401:717, 1999. Maltoporina: modificada a partir de PDB ID 1MAL, T. Schirmer et al., *Science* 267:512, 1995.]

a formação de α -hélices no interior hidrofóbico da bicamada lipídica também estabilizam os barris β , pois quando não há moléculas de água disponíveis para formar ligações de hidrogênio com o oxigênio da carbonila e o nitrogênio da ligação peptídica, o número máximo de ligações de hidrogênio intracadeia fornece a conformação mais estável. As folhas β planares não maximalizam essas interações e geralmente não são encontradas no interior das membranas. Os barris β permitem que todas as ligações de hidrogênio sejam formadas e são comuns entre as proteínas de membrana. As **porinas**, proteínas que permitem que certos solutos polares atravessem a membrana externa de bactérias gram-negativas como a *E. coli*, têm barris β com muitas fitas revestindo a passagem polar transmembrana. As membranas externas das mitocôndrias e dos cloroplastos também contêm vários barris β , talvez como resultado da origem das mitocôndrias e dos cloroplastos como endossimbiontes de bactérias (ver Figura 1-40).

Um polipeptídeo é mais extenso quando em conformação β do que como α -hélice, e apenas de 7 a 9 resíduos de aminoácidos em conformação β são suficientes para atravessar a membrana. Observe que, na conformação β , as cadeias laterais projetam-se alternadamente para cima e para baixo da folha (ver Figura 4-6). Nas fitas β das proteínas de membrana, cada segundo resíduo do segmento que atravessa a membrana é hidrofóbico e interage com a bicamada lipídica; cadeias laterais aromáticas são comumente encontradas na interface lipídeo-proteína. Os outros resíduos podem ou não ser hidrofílicos.

Outra característica notável de muitas proteínas transmembrana com estrutura conhecida é a presença de resíduos de Tyr e Trp na interface entre lipídeo e água (**Figura 11-12**). As cadeias laterais desses resíduos servem aparentemente como âncoras na interface da membrana, capazes de interagir simultaneamente com a fase lipídica central e as fases aquosas em ambos os lados da membrana. Outra generalização sobre a localização de aminoácidos em relação à bicamada é descrita como a **regra do positivo para dentro**: os resíduos positivamente carregados de Lys, His e Arg das proteínas de membrana ocorrem mais comumente na face citoplasmática das membranas.

Lipídeos ligados covalentemente ancoram algumas proteínas de membrana

Algumas proteínas de membrana são ligadas covalentemente a um ou mais lipídeos, que podem ser de vários tipos: ácidos graxos de cadeia longa, isoprenoides, esteróis ou derivados glicosilados de fosfatidilinositol (GPIs; **Figura 11-13**). O lipídeo anexado fornece uma âncora hidrofóbica que se insere na bicamada lipídica e segura a proteína na superfície da membrana. A intensidade da interação hidrofóbica entre a bicamada e a cadeia de hidrocarboneto ligada a uma proteína é suficiente apenas para ancorar a proteína de forma segura, mas muitas proteínas têm mais de uma porção lipídica ligada. Além disso, outras interações, como atrações iônicas entre resíduos de Lys carregados positivamente na proteína e grupos de cabeças polares de lipídeos carregados negativamente, também podem contribuir no efeito de ancoramento a um lipídeo ligado covalentemente. Por exemplo, a proteína MARCKS da membrana plasmática, que interage com filamentos de actina nos processos de

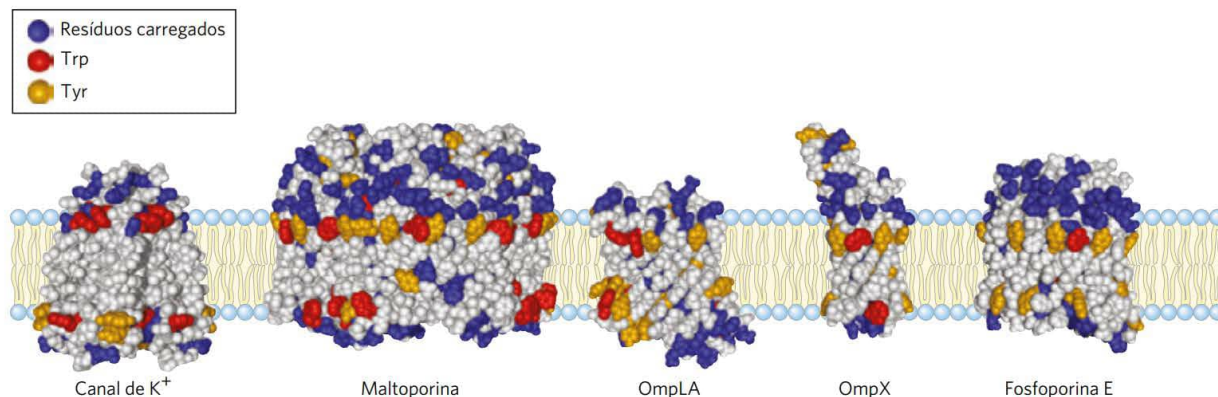


FIGURA 11-12 Resíduos de Tyr e Trp de proteínas de membrana aglomerados na interface água-lípido. O conhecimento das estruturas detalhadas dessas cinco proteínas integrais de membrana foi obtido a partir de estudos cristalográficos. Canal de K^+ da bactéria *Streptomyces lividans* (ver Figura 11-45); maltoporina, OmpLA, OmpX e fosfoporina E são proteínas da membrana externa de *E. coli*. Resíduos de Tyr e Trp são predominantemente encontrados onde a região apolar das cadeias acila se encontra com a região do grupo polar. Resíduos carregados (Lys, Arg, Glu, Asp) são encontrados quase exclusivamente em fases aquosas. [Fontes: canal de K^+ : PDB ID 1BL8, D. A. Doyle et al., *Science* 280:69, 1998. Maltoporina: PDB ID 1AF6, Y. F. Wang et al., *J. Mol. Biol.* 272:56, 1997. OmpLA: PDB ID 1QD5, H. J. Snijder et al., *Nature* 401:717, 1999. OmpX: PDB ID 1QJ9, J. Vogt e G. E. Schulz, *Structure* 7:1301, 1999. Fosfoporina E: PDB ID 1PHO, S. W. Cowan et al., *Nature* 358:727, 1992.]

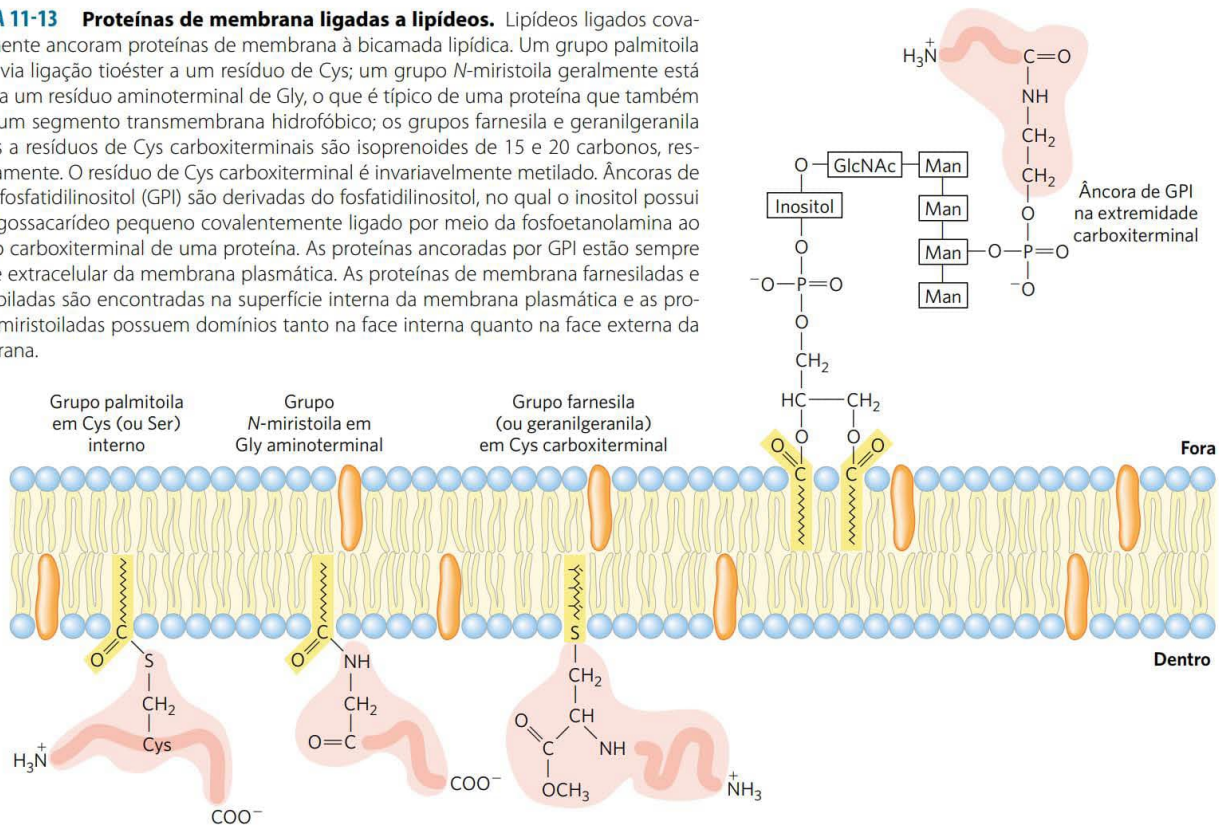
motilidade celular, tem ligada uma porção miristoila, mas também tem a sequência

KKKKRFSFKKSKLSGFSFKNKK
151 175

o que aumenta a afinidade da proteína pela membrana. Três agrupamentos de resíduos de Lys e Arg carregados posi-

tivamente (em azul brilhante) interagem com grupos de cabeças polares de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP_2) negativamente carregados na face citoplasmática da membrana plasmática; cinco resíduos aromáticos (em amarelo brilhante) inseridos na bicamada lipídica. Quando os grupos fosfatos da cabeça do PIP_2 são removidos enzimaticamente, a MARCKS desprende-se da membrana e dissocia-se.

FIGURA 11-13 Proteínas de membrana ligadas a lipídeos. Lipídeos ligados covalentemente ancoram proteínas de membrana à bicamada lipídica. Um grupo palmitoila ligado via ligação tioéster a um resíduo de Cys; um grupo *N*-miristoila geralmente está ligado a um resíduo aminoterminal de Gly, o que é típico de uma proteína que também tenha um segmento transmembrana hidrofóbico; os grupos farnesila e geranilgeranila ligados a resíduos de Cys carboxiterminais são isoprenoides de 15 e 20 carbonos, respectivamente. O resíduo de Cys carboxiterminal é invariavelmente metilado. Âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI) são derivadas do fosfatidilinositol, no qual o inositol possui um oligossacarídeo pequeno covalentemente ligado por meio da fosfoetanolamina ao resíduo carboxiterminal de uma proteína. As proteínas ancoradas por GPI estão sempre na face extracelular da membrana plasmática. As proteínas de membrana farnesiladas e palmitoiladas são encontradas na superfície interna da membrana plasmática e as proteínas miristoiladas possuem domínios tanto na face interna quanto na face externa da membrana.



O lipídeo ligado pode ter um papel mais específico além de meramente ancorar a proteína à membrana. Na membrana plasmática, as **proteínas ancoradas por GPI** estão exclusivamente no lado de fora da membrana e ficam agregadas em certas regiões, como discutido neste capítulo (p. 401), ao passo que outros tipos de proteínas ligadas a lipídeos (ligadas a grupos farnesila ou geranilgeranila; Figura 11-13) estão exclusivamente na face interna. Em células epiteliais polarizadas (como as células epiteliais intestinais; ver Figura 11-41), nas quais as superfícies apicais e basais têm papéis diferentes, as proteínas ancoradas por GPI são direcionadas especificamente à superfície apical. A ligação de um lipídeo específico a uma proteína de membrana recém-sintetizada tem a função de orientar a proteína para sua localização correta na membrana.

Proteínas anfitrópicas associam-se reversivelmente com a membrana

Algumas proteínas anfitrópicas contêm um domínio PH (homologia plectrina), um bolsão que liga especificamente fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato (PIP_3) localizado na face citoplasmática da membrana plasmática. O PIP_3 é formado e degradado em resposta à sinalização por hormônios e outras moléculas. Outro domínio de proteínas conservado, o SH2 (homologia Src), liga-se a proteínas de membrana por um resíduo de tirosina fosforilada (fosfotirosina), mas não pela forma não fosforilada. (Os domínios PH e SH2 serão discutidos com mais detalhes no Capítulo 12.) Desse modo, a associação de muitas proteínas anfitrópicas com a membrana plasmática pode ser controlada reversivelmente pela adição ou remoção enzimática de um único grupo fosforila do fosfatidilinositol ou de um resíduo de Tyr. A associação transiente de proteínas específicas com a membrana é o ponto central de muitas vias de sinalização. Quando duas ou mais proteínas devem reagir em um evento de sinalização, essa interação é facilitada porque elas ficam confinadas no espaço bidimensional da superfície da membrana.

RESUMO 11.1 Composição e arquitetura das membranas

- As membranas biológicas definem os limites celulares, dividem as células em compartimentos separados, organizam as sequências de reações complexas e atuam na recepção de sinal e na transformação de energia.
- As membranas são compostas por lipídeos e proteínas em combinações variáveis particulares para cada espécie, tipo celular e organela. O modelo mosaico fluido, que tem a bicamada lipídica como unidade estrutural básica, dá uma ideia geral das membranas.
- O tráfego de membranas é o movimento de componentes do retículo endoplasmático para e através do complexo de Golgi, onde eles são endereçados para os respectivos destinos finais por meio de alterações covalentes.
- As proteínas integrais de membrana estão mergulhadas dentro da membrana com as cadeias de aminoácidos não polares estabilizadas por contatos com a bicamada lipídica, em vez de ser rodeada pela fase aquosa. As proteínas periféricas de membrana associam-se com a membrana por meio de interações eletrostáticas e liga-

ções de hidrogênio com fosfolipídeos de membrana e proteínas integrais de membrana. As proteínas anfitrópicas associam-se reversivelmente a membranas em resposta a sinais biológicos, como, por exemplo, a fosforilação de lipídeos ou proteínas de membrana ou a remoção de lipídeos ligados covalentemente.

- Muitas proteínas de membrana atravessam várias vezes a bicamada lipídica, com sequências hidrofóbicas de cerca de 20 resíduos de aminoácidos formando α -hélices transmembrana. Em bactérias, barris β de muitas fitas também são comuns nas proteínas integrais de membrana. Resíduos de Tyr e Trp de proteínas transmembrana são comumente encontrados na interface lipídeo-água.
- Algumas proteínas de membrana possuem lipídeos ligados covalentemente que são mediadores na interação com a bicamada.

11.2 Dinâmica da membrana

Uma característica marcante de todas as membranas biológicas é a flexibilidade, ou seja, a capacidade de mudar de forma sem perder a integridade e gerar vazamento. Essa propriedade tem como base as interações não covalentes entre lipídeos na bicamada e a mobilidade permitida aos lipídeos individuais, pois eles não estão ancorados covalentemente uns aos outros. Agora, o foco da discussão será a dinâmica da membrana: os movimentos que ocorrem e as estruturas transitórias permitidas por eles.

Os grupos acila no interior da bicamada estão ordenados em graus variáveis

Embora a estrutura da bicamada lipídica seja estável, as moléculas individuais de fosfolipídeos que participam da composição da membrana têm muita liberdade de movimento (**Figura 11-14**), dependendo da temperatura e da composição lipídica. Abaixo de temperaturas fisiológicas normais, os lipídeos formam um **estado líquido ordenado (L_o)**, estado gelatinoso ou semisólido na bicamada, no qual todos os tipos de movimento de moléculas individuais estão fortemente limitados; a bicamada é paracristalina (**Figura 11-14a**). Acima de temperaturas fisiológicas, cadeias individuais de hidrocarbonetos de ácidos graxos estão em movimento constante produzido pela rotação em torno das ligações carbono-carbono das cadeias laterais acila longas e pela difusão lateral de moléculas lipídicas individuais no plano da bicamada. Esse estado é o **estado líquido desordenado (L_d)** (**Figura 11-14b**). Na transição do estado L_o para o estado L_d , a forma e as dimensões gerais da bicamada são mantidas; o que muda é o grau de movimento (lateral e rotacional) permitido às moléculas lipídicas individuais.

Em temperaturas na faixa fisiológica dos mamíferos (cerca de 20 a 40°C), ácidos graxos saturados de cadeia longa (como 16:0 e 18:0) tendem a se agrupar em uma fase gel L_o , mas as inflexões nas cadeias dos ácidos graxos insaturados (ver **Figura 10-1**) interferem com o agrupamento, favorecendo o estado L_d . Grupos acila de ácidos graxos de cadeia curta são mais móveis do que grupos acila de ácidos graxos de cadeia longa e, portanto, favorecem o estado L_d . O conteúdo de esteróis de uma membrana (que varia muito de acordo

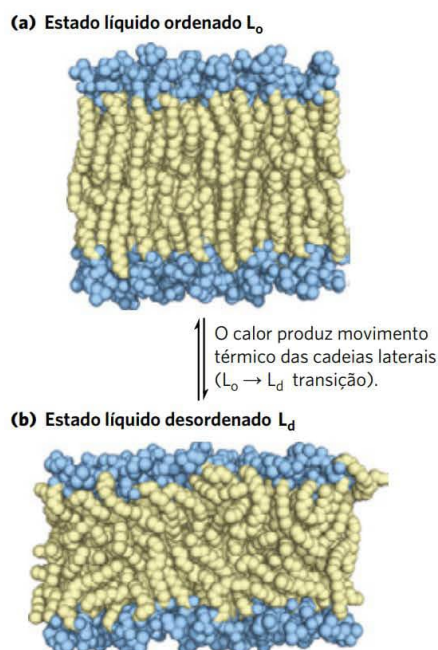


FIGURA 11-14 Dois estados extremos da bicamada lipídica.

(a) No estado ordenado líquido (L_o), os grupos polares das cabeças são arranjados uniformemente na superfície e as cadeias acila quase não apresentam movimento, estando agrupadas em uma geometria regular. (b) No estado líquido desordenado (L_d), ou estado fluido, as cadeias acila sofrem muito mais movimentação térmica e não apresentam organização regular. O estado dos lipídeos nas membranas biológicas é mantido entre esses extremos. [Fonte: H. Heller et al., *J. Phys. Chem.* 97:8343, 1993.]

com o organismo e a organela; Tabela 11-1) é outro determinante importante do estado do lipídeo. Os esteróis (como o colesterol) apresentam efeitos paradoxais na fluidez da bicamada: eles interagem com fosfolipídeos contendo cadeias acila graxas insaturadas, compactando-as e limitando sua movimentação na bicamada. De modo contrário, a associação com esfingolipídeos e fosfolipídeos que tenham cadeias acila graxas longas e saturadas tende a fazer a membrana

ficar mais fluida e adotar o estado L_o mesmo sem colesterol. Em membranas biológicas compostas por uma diversidade de fosfolipídeos e esfingolipídeos, o colesterol tende a se associar com esfingolipídeos e formar regiões no estado L_o rodeado por regiões pobres em colesterol no estado L_d (ver discussão sobre balsas de membrana a seguir).

As células regulam sua composição lipídica para conseguir uma fluidez de membrana constante sob várias condições de crescimento. Por exemplo, as bactérias sintetizam mais ácidos graxos insaturados e menos saturados quando cultivadas em baixas temperaturas, em comparação com o cultivo em temperaturas mais altas (Tabela 11-2). Como resultado desse ajustamento na composição lipídica, as membranas de bactérias cultivadas em altas ou baixas temperaturas têm aproximadamente o mesmo grau de fluidez. Supõe-se que isso seja essencial para as funções de muitas proteínas mergulhadas na membrana, como enzimas, transportadores e receptores, que agem na bicamada lipídica.

O movimento de lipídeos através da bicamada necessita de catálise

Em temperaturas fisiológicas, uma molécula de lipídeo difunde-se de uma face da membrana (monocamada) para a outra face dela muito lentamente (**Figura 11-15a**), se é que isso ocorre. Por outro lado, na maioria das membranas a difusão lateral *no mesmo plano* da bicamada é muito rápida (**Figura 11-15b**). O movimento de uma face para a outra (movimento “flip-flop”) requer que um grupo polar ou carregado deixe seu meio aquoso e mova-se para o interior hidrofóbico da bicamada, processo com grande variação de energia livre positiva. Há, entretanto, situações em que esse movimento é essencial. Por exemplo, no retículo endoplasmático (RE), glicerofosfolipídeos de membrana são sintetizados na superfície citosólica, ao passo que esfingolipídeos são sintetizados ou modificados na superfície luminal. Para saírem de seu local de síntese e chegarem ao destino onde finalmente ficam depositados, esses lipídeos devem passar por uma difusão *flip-flop*.

Proteínas denominadas flipases, flopases e flip-flopases (**Figura 11-15c**) facilitam o movimento através da mem-

TABELA 11-2 Composição de ácidos graxos de células de *E. coli* cultivadas a diferentes temperaturas

	Porcentagem do total de ácidos graxos ^a			
	10°C	20°C	30°C	40°C
Ácido mirístico (14:0)	4	4	4	8
Ácido palmítico (16:0)	18	25	29	48
Ácido palmitoleico (16:1)	26	24	23	9
Ácido oleico (18:1)	38	34	30	12
Ácido hidroximirístico	13	10	10	8
Proporção entre insaturados e saturados ^b	2,9	2,0	1,6	0,38

Fonte: dados de A. G. Marr e J. L. Ingraham, *J. Bacteriol.* 84:1260, 1962.

^aA composição exata de ácidos graxos depende não apenas da temperatura de crescimento, mas também do estágio de crescimento e da composição do meio de crescimento.

^bRelações calculadas como porcentagem total de 16:1 mais 18:1, dividido pela porcentagem de 14:0 mais 16:0. O ácido hidroximirístico foi omitido deste cálculo.

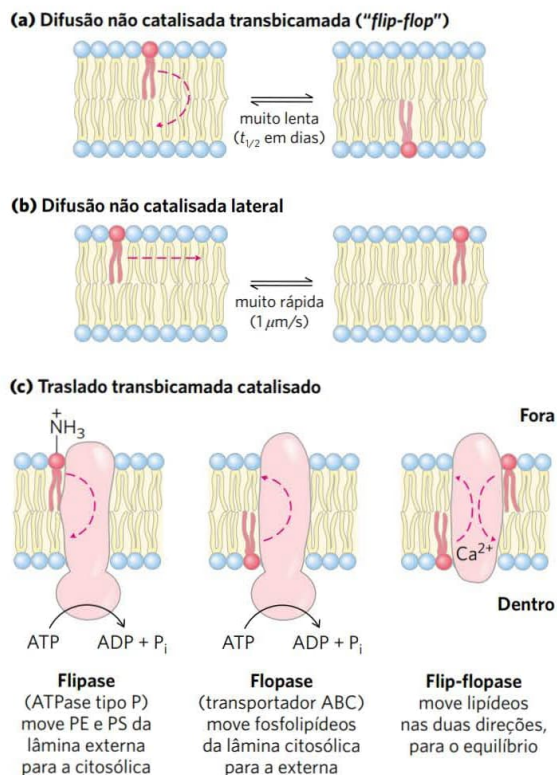


FIGURA 11-15 Movimento de um único fosfolípido na bicamada. (a) O movimento não catalisado de uma das faces da membrana para a outra é muito lento, mas (b) a difusão lateral na lâmina é muito rápida e não necessita de catálise. (c) Três tipos de trasladores de fosfolípidos na membrana plasmática. PE é fosfatidiletanolamina; PS é fosfatidilserina.

brana (translocação) de moléculas individuais de lipídeos, proporcionando uma via energeticamente mais favorável e muito mais rápida do que o movimento não catalisado. A combinação de biossíntese assimétrica dos lipídeos de membrana, difusão *flip-flop* não catalisada muito lenta e presença de trasladores lipídicos dependentes de energia pode ser responsável pela assimetria transbicamada na composição lipídica mostrada na Seção 11.1. Além de contribuir na assimetria da composição, o transporte de lipídeos dependente de energia para uma das faces da bicamada pode, pela criação de uma superfície maior em um lado da bicamada, ser importante na geração da curvatura da membrana essencial para o brotamento de vesículas.

As **flipases** catalisam o traslado dos *aminofosfolípidos* fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina da face extracelular para a citosólica, contribuindo para a distribuição assimétrica de fosfolípidos: fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina, principalmente na face citosólica, e esfingolipídeos e fosfatidilcolina na camada externa. Manter a fosfatidilserina fora da camada extracelular é importante: a sua exposição na superfície celular externa desencadeia apoptose (morte celular programada; ver Capítulo 12) e englobamento por macrófagos com receptores para fosfatidilserina. As flipases também agem no RE, onde elas movem fosfolípidos recém-sintetizados do local de síntese na face citosólica para a lâmina luminal. As flipases consomem aproximadamente um

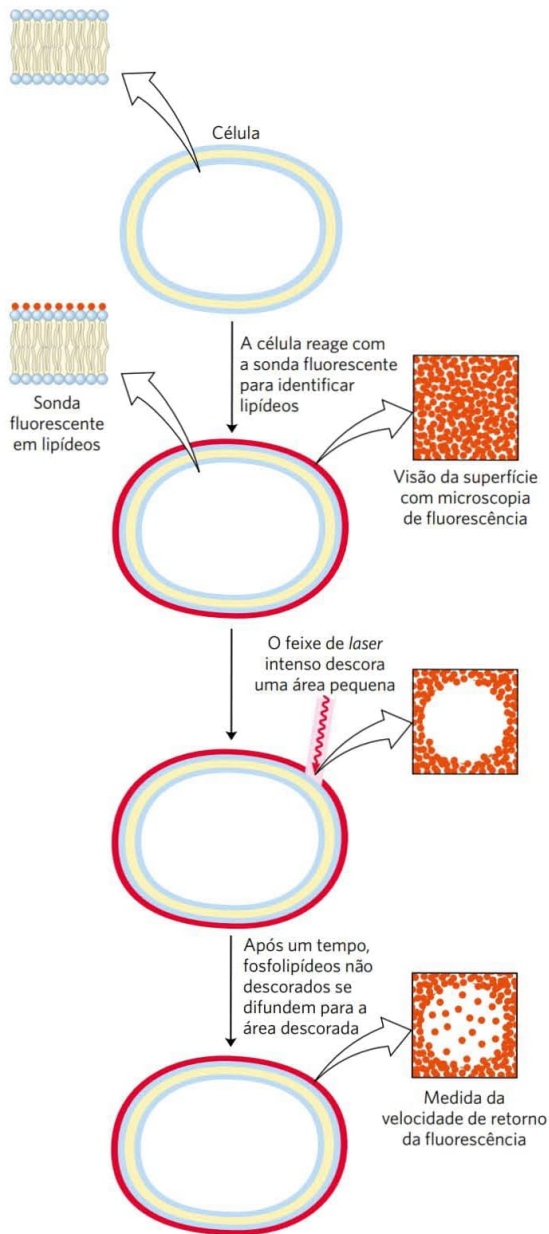
ATP por molécula de fosfolípido trasladada, sendo estrutural e funcionalmente relacionadas às ATPases do tipo P (transportadores ativos), descritas na página 413.

Dois outros tipos de atividades de translocação de lipídeos são conhecidos, mas menos bem caracterizados. As **flopases** movem fosfolípidos e esteróis da face citosólica da membrana plasmática para a face extracelular e, assim como as flipases, dependem de ATP. As flopases pertencem à família de transportadores ABC, descritos na página 413. Todos os transportadores ABC transportam ativamente substâncias hidrofóbicas através da membrana plasmática. As **flip-flopases** são proteínas que movem qualquer fosfolípido da membrana através da bicamada a favor do gradiente de concentração (da face com maior concentração para a face com menor concentração) e sua atividade não depende de ATP. A atividade da flip-flopase leva a uma distribuição aleatória controlada da composição dos grupos polares nas duas faces da bicamada. A atividade aumenta muito com o aumento da concentração do Ca^{2+} citosólico, que pode resultar de ativação celular, dano celular ou apoptose. Como comentado anteriormente, a exposição da fosfatidilserina na superfície externa sinaliza a célula para apoptose e englobamento por macrófagos. A rodopsina, a proteína que detecta luz nos olhos dos vertebrados, tem uma segunda atividade, ela é uma "misturase" que facilita aleatoriedade e tem uma velocidade que ultrapassa 10.000 fosfolípidos por molécula de proteína por segundo. Finalmente, pensa-se que um grupo de proteínas que age principalmente na movimentação de fosfatidilinositol através das bicamadas lipídicas, as proteínas de transferência de fosfatidilinositol, tem um papel importante na sinalização lipídica e no tráfego de membrana.

Lipídeos e proteínas difundem-se lateralmente na bicamada

Moléculas lipídicas individuais podem mover-se lateralmente no plano da membrana, trocando de lugar com moléculas lipídicas vizinhas. Isto é, elas possuem movimento browniano dentro da bicamada (Figura 11-15b), que pode ser muito rápido. Uma molécula na face externa da membrana plasmática de eritrócito, por exemplo, pode difundir-se lateralmente de forma tão rápida que ela circunavega o eritrócito em segundos. Essa difusão lateral rápida no plano da bicamada tende a tornar aleatórias as posições das moléculas individuais em poucos segundos.

A difusão lateral pode ser mostrada experimentalmente ao se anexar sondas fluorescentes aos grupos polares dos lipídeos e usar microscopia de fluorescência para acompanhar as sondas no decorrer do tempo (Figura 11-16). Em uma das técnicas, uma pequena região ($5 \mu\text{m}^2$) de uma superfície celular com lipídeos marcados por fluorescência é descorada por uma radiação intensa, de forma que o pedaço irradiado já não fluoresça mais quando visto com uma luz menos intensa no microscópio de fluorescência. Entretanto, dentro de milissegundos, a região recupera a fluorescência na medida em que moléculas lipídicas não descoradas se difundem para a parte descorada e as moléculas lipídicas descoradas se difundem e se afastam dali. A velocidade de recuperação da fluorescência após a fotodescoloração, ou



FRAP (do inglês, *fluorescence recovery after photobleaching*), é uma medida da velocidade de difusão lateral dos lipídios. Usando a técnica de FRAP, pesquisadores mostraram que alguns lipídios de membrana se difundem lateralmente em velocidades de até $1 \mu\text{m/s}$.

Outra técnica, denominada rastreamento de uma só partícula, permite acompanhar o movimento de uma única molécula lipídica na membrana plasmática em uma escala de tempo muito menor. Os resultados desses estudos confirmaram que moléculas de lipídios se difundem lateralmente e com rapidez dentro de uma pequena região delimitada da superfície celular, porém o movimento de uma dessas regiões para uma região próxima ("difusão por salto") é raro. Os lipídios de membrana comportam-se como se eles estivessem presos por cercas que apenas ocasionalmente eles podem atravessar por difusão por salto (Figura 11-17).

FIGURA 11-16 Medida da velocidade de difusão lateral de lipídios pela recuperação da fluorescência após fotodescoloração (FRAP). Os lipídios na lâmina externa da membrana plasmática estão marcados pela reação com uma sonda à qual a membrana é impermeável (em vermelho), de modo que a superfície é identificada uniformemente quando vista sob um microscópio de fluorescência. Uma área pequena é descorada pela irradiação com um feixe de *laser* intenso e torna-se não fluorescente. Com o passar do tempo, moléculas lipídicas marcadas difundem-se para a região descorada, que se torna, então, novamente fluorescente. Os pesquisadores podem acompanhar o curso temporal do retorno da fluorescência e determinar um coeficiente de difusão para o lipídeo marcado. As velocidades de difusão são geralmente altas. Um lipídeo que se move com essa velocidade poderia circunavegar uma célula de *E. Coli* em um segundo. (O método FRAP também pode ser usado para medir a difusão lateral de proteínas de membrana.)

Muitas proteínas de membrana se movem como se fluíssem em um mar de lipídios. Assim como os lipídios de membrana, essas proteínas estão livres para se difundirem lateralmente no plano da bicamada e estão em constante movimento, mostrado usando a técnica de FRAP em proteínas de superfície identificadas por fluorescência. Algumas proteínas de membrana se associam e formam grandes agregados (regiões) na superfície da célula ou da organela, nos quais moléculas proteicas não se movem em relação umas às outras; por exemplo, receptores de acetilcolina formam regiões densas, quase cristalinas nas membranas plasmáticas de neurônios em sinapses. Outras proteínas de membrana são ancoradas às estruturas internas para impedir que se difundam livremente. Na membrana de eritrócito, tanto a glicoforina quanto o trocador cloreto-bicarbonato (p. 410) são ligados à espectrina, uma proteína filamentosa do citoesqueleto (Figura 11-18). Uma explicação possível

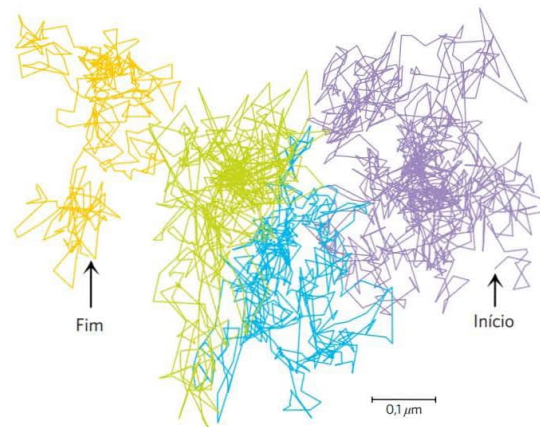


FIGURA 11-17 Difusão de moléculas lipídicas individuais. O movimento em uma superfície celular de uma única molécula lipídica marcada com fluorescência é registrado em vídeo por microscopia de fluorescência, com uma resolução temporal de $25 \mu\text{s}$ (equivalente a 40.000 quadros/s). A trajetória mostrada aqui representa uma molécula acompanhada durante 56 ms (2.250 quadros); a trajetória inicia na área roxa e continua pela azul, verde e cor de laranja. O padrão de movimento indica uma difusão rápida em uma região confinada (com aproximadamente 250 nm de diâmetro, mostrado em uma única cor), com saltos ocasionais para uma região adjacente. Essa observação sugere que os lipídios ficam encurralados por cercas moleculares, que eles podem pular ocasionalmente. [Fonte: cortesia de Takahiro Fujiwara, Ken Ritchie, Hideji Murakoshi, Ken Jacobson e Akihiro Kusumi.]

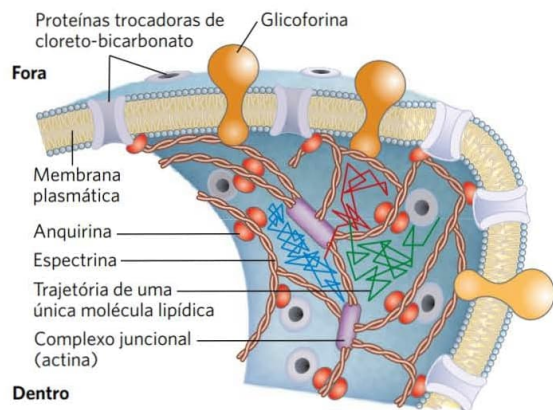


FIGURA 11-18 Movimento restrito do trocador de cloreto-bicarbonato e da glicoforina de eritrócito. As proteínas atravessam a membrana e são amarradas à espectrina, uma proteína do citoesqueleto, por outra proteína, a anquirina, limitando sua mobilidade lateral. A anquirina está ancorada na membrana por uma cadeia lateral de palmitoila ligada covalentemente à proteína (ver Figura 11-13). A espectrina, uma proteína filamentosa longa, é unida por ligação cruzada a complexos juncionais contendo actina. Uma rede de moléculas de espectrina em ligação cruzada, associada à face citoplasmática da membrana plasmática, estabiliza a membrana, tornando-a resistente à deformação. Essa rede de proteínas de membrana ancoradas pode formar o “curral” sugerido no experimento mostrado na Figura 11-17. As trajetórias lipídicas mostradas na figura estão confinadas a diferentes regiões delimitadas pelas proteínas de membrana amarradas. Ocasionalmente, a molécula lipídica (trajetória verde) salta de um curral para outro (trajetória azul) e depois para outro (trajetória vermelha).

para o padrão de difusão lateral de moléculas de lipídeos, mostrado na Figura 11-17, é que as proteínas de membrana que ficam imobilizadas devido à associação com espectrina formam as “cercas” que delimitam regiões dentro das quais pode ocorrer movimentação irrestrita de lipídeos.

Esfingolipídeos e colesterol agrupam-se em balsas, ou “raftes”, de membrana

Foi constatado que a difusão de lipídeos de membrana de uma lâmina da bicamada para a outra é muito lenta, a menos que seja catalisada, e que diferentes espécies lipídicas da membrana plasmática estão distribuídas assimetricamente nas duas lâminas da bicamada (Figura 11-5). Mesmo em uma única lâmina da membrana, a distribuição lipídica não é uniforme. Os glicoesfingolipídeos (cerebrosídeos e gangliosídeos), que geralmente contêm cadeias longas de ácidos graxos saturados, formam agregados transitórios na camada externa que exclui glicerofosfolipídeos, que, por sua vez, normalmente contêm um grupo acila graxo insaturado e um grupo acila saturado menor. Os grupos acila saturados longos de esfingolipídeos podem formar associações mais estáveis e compactas com o sistema de anéis longo do colesterol do que as cadeias mais curtas e geralmente insaturadas de fosfolipídeos. Os **microdomínios** formados por colesterol-esfingolipídeo na membrana plasmática tornam a bicamada levemente mais espessa e mais ordenada (menos fluida) que as regiões vizinhas ricas em fosfolipídeos e mais difícil de dissolver com detergentes não iônicos. Elas se comportam parecendo **raftes** de esfingolipídeos líquidos ordenados à deriva em um oceano de fosfolipídeos líquidos desordenados (**Figura 11-19**). Pro-

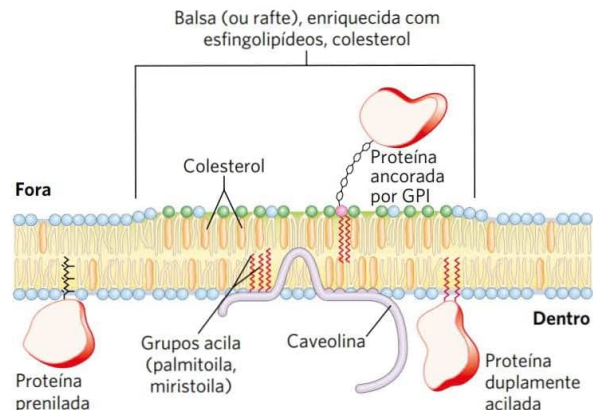


FIGURA 11-19 Microdomínios na membrana (balsas ou raftes). As associações estáveis de esfingolipídeos e colesterol na face externa formam um microdomínio, levemente mais espesso do que em outras regiões da membrana, que é enriquecido com tipos específicos de proteínas de membrana. Proteínas ancoradas por GPI ficam salientes na lâmina externa dessas balsas e proteínas com um ou vários grupos acila de cadeia longa ligados covalentemente são comumente encontradas na face interna. Raftes curvadas para dentro, denominadas caveólas, são especialmente ricas em proteínas denominadas caveolinas (ver Figura 11-20). Proteínas ligadas com o grupo prenila (como a Ras; ver Quadro 12-1) tendem a ser excluídas das balsas.

teínas com seções de hélice hidrofóbicas relativamente curtas (19 a 20 resíduos de aminoácidos) não podem atravessar a espessura da bicamada em balsas e, portanto, tendem a ser excluídas. Proteínas com hélices hidrofóbicas longas (24 a 25 resíduos) segregam nas regiões da bicamada das balsas que são mais espessas enquanto todo o comprimento da hélice é estabilizado por efeito hidrofóbico.

As raftes lipídicas são notavelmente ricas em duas classes de proteínas integrais de membrana, que têm ligados covalentemente dois tipos de lipídeos. As proteínas integrais de uma das classes têm dois ácidos graxos saturados de cadeia longa (dois grupos palmitoila ou um grupo palmitoila e um grupo miristoila) ligados covalentemente por meio de resíduos de Cys. As da segunda classe, as proteínas ancoradas por GPI, têm um glicosilfosfatidilinositol no resíduo carboxiterminal (Figura 11-13). Supostamente, essas âncoras lipídicas, assim como as cadeias acila longas e saturadas dos esfingolipídeos, formam associações mais estáveis com o colesterol e com os longos grupos acila em balsas do que com os fosfolipídeos vizinhos. (É notável que outras proteínas ligadas a lipídeos, aquelas com grupos isoprenila ligados covalentemente, como o farnesila, *não* estejam preferencialmente associadas com a lâmina externa das balsas de esfingolipídeos/colesterol; ver Figura 11-19.) Os domínios de “raftes” e o “oceano” da membrana plasmática não são separados de maneira rígida. As proteínas de membrana podem se mover para dentro e para fora das raftes de lipídeos em frações de segundo. Contudo, em uma escala de tempo menor (microsegundos), mais relevante para muitos processos bioquímicos mediados pela membrana, muitas dessas proteínas residem principalmente em uma balsa.

É possível estimar a fração da superfície celular que é ocupada por raftes a partir da fração da membrana plasmática que resiste à solubilização por detergente, fração que pode alcançar até 50% em alguns casos, isto é, as balsas

cobrem metade do oceano. Medidas indiretas feitas em fibroblastos em cultura sugerem um diâmetro aproximado de 50 nm para uma raft individual, que corresponde a uma região contendo alguns milhares de esfingolípídeos e talvez 10 a 50 proteínas de membrana. Como a maioria das células expressa mais do que 50 tipos diferentes de proteínas na membrana plasmática, é provável que uma única balsa contenha apenas um subconjunto de proteínas de membrana e que essa segregação de proteínas de membrana tenha um significado do ponto de vista funcional. Para um processo que envolve a interação de duas proteínas de membrana, a presença delas em uma única raft aumentaria muito a probabilidade de colisão entre elas. Alguns receptores de membrana e proteínas de sinalização, por exemplo, parecem estar juntos em rafts de membrana. Experimentos mostram que a sinalização por essas proteínas pode ser interrompida por manipulações que removem o colesterol da membrana plasmática e destroem as rafts lipídicas.

A **caveolina** é uma proteína integral de membrana com dois domínios globulares conectados por um domínio hidrofóbico em forma de grampo de cabelo, que liga a proteína à lâmina citoplasmática da membrana plasmática. Os três grupos palmitoila ligados ao domínio carboxiterminal globular aumentam o ancoramento da proteína à membrana. As caveolinas formam dímeros e se associam com regiões da membrana ricas em colesterol. A presença de dímeros de caveolina força a bicamada lipídica associada a fazer uma curvatura para dentro, formando a **cavéola** (“pequenas cavernas”) na superfície celular (**Figura 11-20**). As cavéolas são rafts incomuns: elas envolvem as *duas* lâminas da bicamada – a lâmina citoplasmática, a partir da qual o domínio globular da caveolina se projeta, e a lâmina extracelular, uma raft de esfingolípídeo/colesterol típica associada com proteínas ancoradas por GPI. As cavéolas participam de várias funções celulares, incluindo o tráfego de membrana no interior celular e a transdução de sinais externos em respostas celulares. Os receptores para a insulina e outros fatores de crescimento, assim como certas proteínas ligadas ao GPI, e proteínas-quinases associadas à sinalização transmembrana, parecem estar localizados em rafts e talvez em cavéolas. Serão discutidos alguns possíveis papéis das rafts em processos de sinalização no Capítulo 12.

As cavéolas também propiciam uma maneira de expandir a superfície celular. A bicamada lipídica, por si só, não é elástica, mas se as cavéolas existentes perderem as moléculas

de caveolina que têm associadas como resultado de um sinal regulatório, elas achatam-se na membrana plasmática (**Figura 11-20c**). O efeito é um aumento da área da superfície, possibilitando que a célula se expanda sem explodir em resposta a um estresse osmótico ou de outro tipo.

A curvatura e a fusão de membrana são fundamentais para muitos processos biológicos

As caveolinas não são as únicas a induzirem curvaturas nas membranas. Mudanças de curvatura são fundamentais para uma das mais notáveis características das membranas biológicas: a capacidade de se fundir com outras membranas

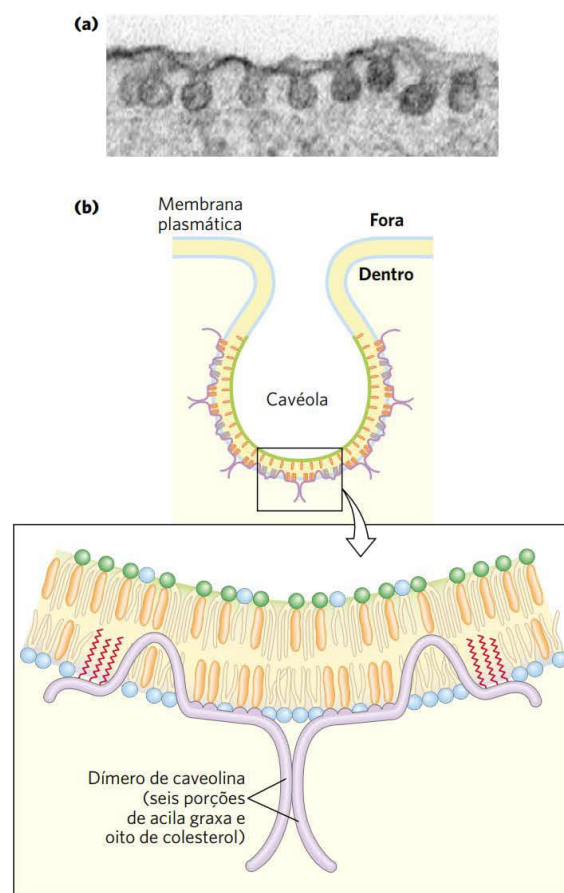
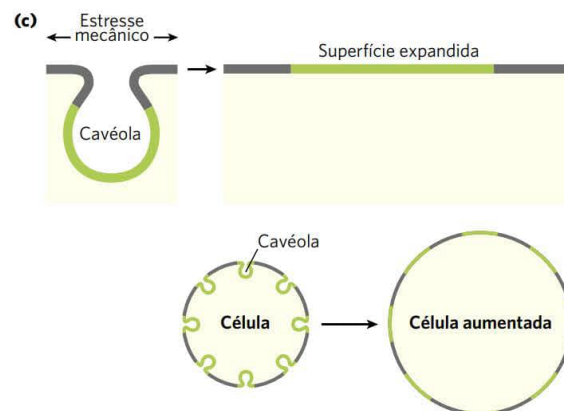


FIGURA 11-20 A caveolina força uma curvatura da membrana para o lado de dentro. Cavéolas são pequenas invaginações na membrana plasmática, como aparece na (a) micrografia eletrônica de um adipócito identificado na superfície com um marcador eletrodenso. (b) Esquema mostrando a localização e o papel de um dímero de caveolina na formação de uma curvatura da membrana para o lado de dentro. Cada monômero de caveolina possui um domínio hidrofóbico central e três grupos acila de cadeia longa (em vermelho), os quais seguram a molécula no interior da membrana plasmática. Quando vários dímeros de caveolina ficam concentrados em uma pequena região (uma raft), eles forçam a curvatura na bicamada lipídica, formando a cavéola. As moléculas de colesterol na bicamada estão mostradas em cor de laranja. (c) O achatamento de cavéolas permite que a membrana plasmática se expanda em resposta a vários tipos de estresse. [Fonte: (a) cortesia R. G. Parton. Reimpressa, com permissão, de Macmillan Publishers, Ltd.: *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8:185-194, Fig. 1a. ©2007.]



sem perder a continuidade. Embora as membranas sejam estáveis, elas não são estáticas. Dentro do sistema de endomembranas eucarióticas (que inclui a membrana nuclear, o retículo endoplasmático, o complexo de Golgi e várias vesículas pequenas), os compartimentos membranosos se reorganizam constantemente. As vesículas brotam do RE para carregar lipídeos e proteínas recém-sintetizados para organelas e para a membrana plasmática. Exocitose, endocitose, divisão celular, fusão entre óvulo e espermatozoide e a entrada de vírus envelopados em membrana para dentro da célula hospedeira envolvem uma reorganização da membrana que necessita da fusão de dois segmentos de membrana sem perda da continuidade (**Figura 11-21**). A maioria desses processos começa com um aumento local na curvatura da membrana. Uma proteína que seja intrinsecamente curvada ao se ligar à membrana pode forçar a bicamada a se curvar (**Figura 11-22**). A energia de ligação fornece a força motriz para aumentar a curvatura da bicamada. De forma alternativa, várias subunidades de uma proteína que ajuda a dar forma para a membrana podem ser montadas, formando complexos supramoleculares curvos e estabilizando curvas que espontaneamente se formam na bicamada. Por exemplo, uma superfamília de proteínas contendo **domínios BAR** (denominados a partir dos primeiros três membros da família que foram identificados: BIN1, amfifisina e RVS167) podem agrupar-se de forma crescente, adquirindo o formato de um andaime, que se liga à superfície da membrana, forçando ou favorecendo a curvatura da membrana. Os domínios BAR são constituídos por espirais enroladas que formam dímeros curvados longos e finos com

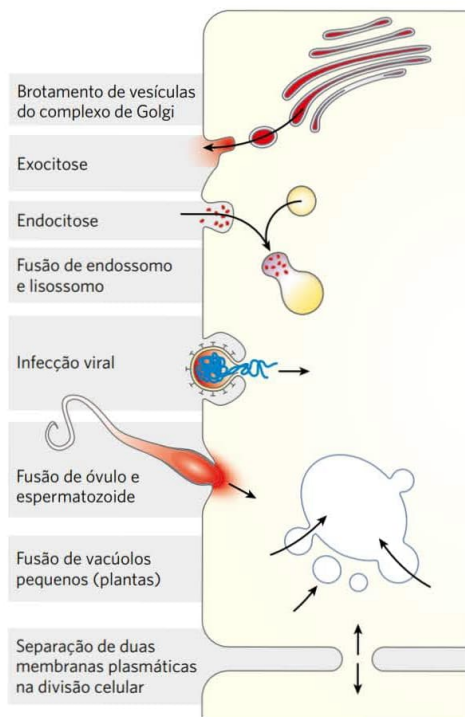


FIGURA 11-21 Fusão de membranas. A fusão de duas membranas é fundamental em um grande número de processos celulares envolvendo organelas e a membrana plasmática.

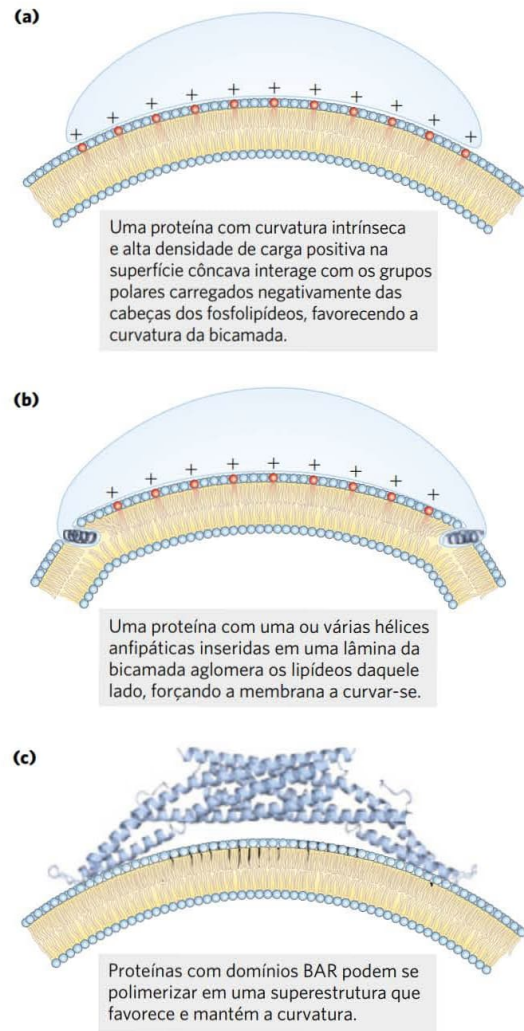


FIGURA 11-22 Três modelos de curvatura de membrana induzida por proteína. [Fontes: (a, b) informações de B. Qualmann et al., *EMBO J.* 30:3501, 2011, Fig. 1. (c) Informações de B. J. Peter et al., *Science* 303:495, 2004, Fig. 1A.]

uma superfície côncava carregada positivamente que tende a formar interações iônicas com grupos carregados negativamente dos lipídeos de membrana PIP_2 e PIP_3 . A formação enzimática desses lipídeos contendo inositol pode marcar uma área da membrana para a criação de uma curvatura para dentro por uma proteína BAR (**Figura 11-22**). Algumas dessas proteínas BAR também têm uma região helicoidal que se insere em uma lâmina da bicamada, expandindo sua área em relação à outra lâmina, forçando a curvatura.

A fusão específica de duas membranas requer que: (1) elas se reconheçam mutuamente; (2) as suas superfícies fiquem justapostas, o que requer a remoção de moléculas de água normalmente associadas aos grupos polares das cabeças dos lipídeos; (3) as estruturas das suas bicamadas sejam rompidas localmente, resultando em fusão entre a lâmina externa de cada uma das membranas (hemifusão); e (4) as bicamadas se fundam, formando uma bicamada contínua única. A fusão que ocorre na endocitose mediada por receptor ou na secreção regulada, também requer

que (5) o processo seja desencadeado em tempo adequado ou em resposta a um sinal específico. Proteínas integrais, chamadas de **proteínas de fusão**, medeiam esses eventos, proporcionando reconhecimento específico e uma distorção local transitória da estrutura da bicamada que favorece a fusão de membrana. (Observe que essas proteínas de fusão não têm relação com os produtos codificados por dois genes fusionados, também chamados de proteínas de fusão, discutidos no Capítulo 9.)

Um exemplo bem estudado de fusão ocorre nas sinapses, quando vesículas intracelulares de neurônios carregadas com neurotransmissor se fundem com a membrana plasmática. Células de leveduras também servem de exemplo que pode ser confirmado experimentalmente de sistemas nos quais há fusão de vesículas com a membrana plasmática e liberação de produtos de secreção. Esses dois processos envolvem proteínas de uma família denominada SNAREs (**Figura 11-23**). SNAREs presentes na face citoplasmática de vesículas intracelulares são denominadas **v-SNAREs** (*v* de vesícula) e as presentes na membrana-alvo (“*target*”) na qual a vesícula se funde (a membrana plasmática no caso de exocitose) são denominadas **t-SNAREs** (*t* de *target*). A proteína NSF regula a interação entre as SNAREs. Durante a fusão, a v-SNARE e a t-SNARE ligam-se uma à outra e sofrem uma mudança estrutural que produz um feixe de bastonetes longos e finos feitos de hélices de ambas as SNAREs e de duas hélices de SNAP25 (**Figura 11-23**). As duas SNAREs inicialmente interagem pelas respectivas extremidades e, então, fecham-se em zíper em um feixe de hélices. Essa mudança estrutural faz as duas membranas entrarem em contato, o que inicia a fusão de suas bicamadas lipídicas. Outra maneira de designar as SNAREs é com base nas características estruturais das proteínas: R-SNAREs têm um resíduo de Arg que é crítico para a função, e nas Q-SNAREs o resíduo crítico é Gln. Normalmente, R-SNAREs agem como v-SNAREs e Q-SNAREs agem como t-SNAREs. James E. Rothman, Randy W. Schekman e Thomas C. Südhof receberam o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina por terem elucidado as bases moleculares do tráfego e da fusão de membranas.



Thomas C. Südhof, Randy W. Schekman e James E. Rothman
[Fonte: Alban Wytters/Sipa USA/AP Images.]



O complexo formado por SNAREs e SNAP25 é o alvo de muitas toxinas altamente potentes. A toxina de *Clostridium botulinum* é uma protease bacteriana que cliva ligações específicas na proteína SNARE, impedindo a

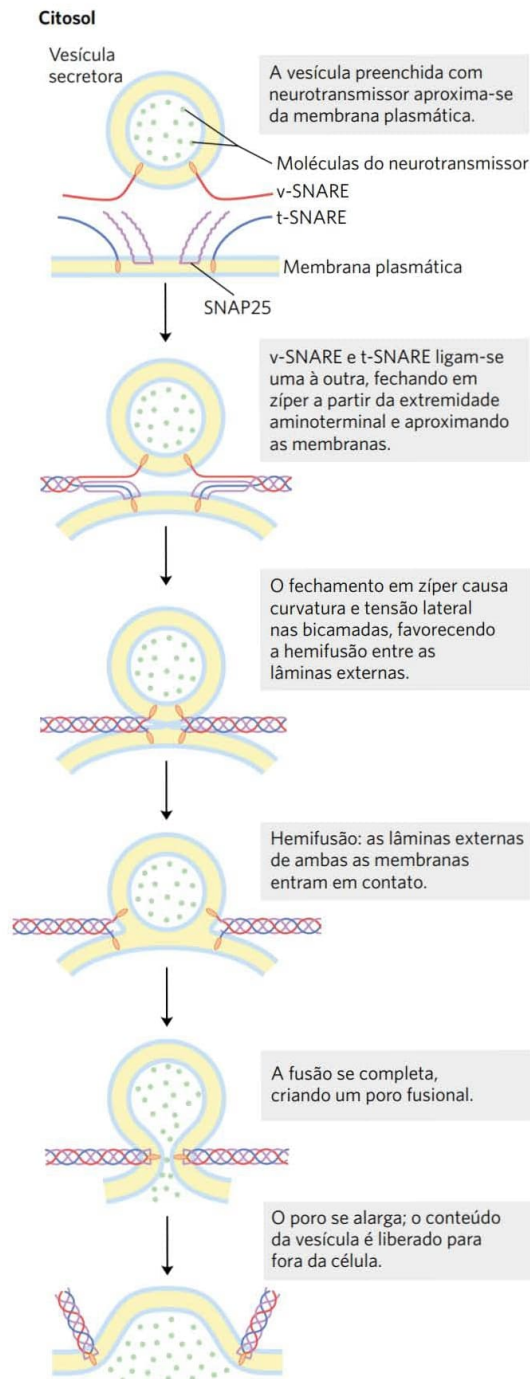


FIGURA 11-23 Fusão das membranas durante a liberação de neurotransmissores na sinapse. A membrana da vesícula secretora contém a sinaptobrevina v-SNARE (em vermelho). A membrana-alvo (plasmática) contém a sintaxina t-SNARE (em azul) e SNAP25 (em roxo). Quando um aumento local da $[Ca^{2+}]$ sinaliza para a liberação do neurotransmissor, v-SNARE, SNAP25 e t-SNARE interagem, formando um feixe enrolado de quatro α -hélices, aproximando as duas membranas e rompendo localmente a bicamada. Isso leva primeiro à hemifusão, unindo as monocamadas externas das duas membranas, para, então, completar a fusão da membrana e liberar o neurotransmissor. O NSF (fator de fusão sensível à *N*-etilmaleimida) age dissociando o complexo SNARE quando a fusão se completa. [Fonte: informações de Y. A. Chen e R. H. Scheller, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2:98, 2001.]

neurotransmissão e provocando paralisia e morte. Devido à alta especificidade para essas proteínas, a toxina botulínica purificada tem servido como ferramenta poderosa no detalhamento do mecanismo de liberação de neurotransmissor *in vivo* e *in vitro*. Em pequenas quantidades, a toxina botulínica (Botox) é usada em medicina para tratar disfunções dos músculos dos olhos e do pescoço e tem uso como cosmético para remover rugas da pele. A toxina tetânica, produzida pela bactéria *Clostridium tetani* também é uma protease com alta especificidade para proteínas SNARE. Ela causa espasmos musculares dolorosos e rigidez dos músculos voluntários, cujo sintoma característico é o trismo (contratura dolorosa da mandíbula). ■

As proteínas integrais da membrana plasmática estão envolvidas na adesão de superfície, na sinalização e em outros processos celulares

Várias famílias de proteínas integrais da membrana plasmática fornecem pontos específicos para a ligação entre células ou entre células e proteínas da matriz extracelular. As **integrinas** são proteínas de adesão à superfície que controlam a interação da célula com a matriz extracelular e com outras células, incluindo alguns patógenos. As integrinas também carregam sinais em ambos os sentidos através da membrana plasmática, integrando informação acerca dos meios extra e intracelulares. Todas as integrinas são proteínas heterodiméricas compostas de duas subunidades diferentes, α e β , sendo que cada subunidade é ancorada à membrana por uma única hélice transmembrana. Os grandes domínios extracelulares das subunidades α e β combinam-se para formar um sítio de ligação específico para proteínas extracelulares, como o colágeno e a fibronectina, que contém um determinante comum de ligação à integrina, a sequência Arg-Gly-Asp (RGD).

Outras proteínas da membrana plasmática envolvidas na adesão a superfícies são as **caderinas**, que sofrem interações homofílicas (“do mesmo tipo”) com caderinas idênticas de uma célula adjacente. As **selectinas** têm domínios extracelulares que, na presença de Ca^{2+} , ligam polissacarídeos específicos à superfície de uma célula adjacente. As selectinas estão presentes principalmente em vários tipos de células sanguíneas e nas células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos (ver Figura 7-32). Elas são uma parte essencial do processo de coagulação sanguínea.

As proteínas integrais de membrana participam em muitos outros processos celulares. Elas servem de transportadores e canais iônicos (discutido na Seção 11.3) e de receptores para hormônios, neurotransmissores e fatores de crescimento (Capítulo 12). São fundamentais para a fosforilação oxidativa e a fotofosforilação (Capítulo 19), assim como o reconhecimento célula-célula e célula-antígeno no sistema imune (Capítulo 5). As proteínas integrais têm papéis importantes na fusão de membranas que acompanha a exocitose, a endocitose e a entrada de muitos tipos de vírus nas células hospedeiras.

RESUMO 11.2 Dinâmica da membrana

- Os lipídeos das membranas biológicas podem existir em estados líquido ordenado ou líquido desordenado. Neste último, o movimento térmico das cadeias acila torna

o interior da bicamada fluido. A fluidez é afetada pela temperatura, pela composição de ácidos graxos e pelo conteúdo de esteroides.

- A difusão de ponta-cabeça (*flip-flop*) de lipídeos entre as lâminas interna e externa da membrana é muito lenta, exceto quando especificamente catalisada por flippases, floppases ou flip-floppases.
- Os lipídeos e as proteínas podem difundir-se lateralmente no plano da membrana, mas essa mobilidade é limitada por interações das proteínas de membrana com estruturas do citoesqueleto e interações dos lipídeos com rafts lipídicas. Uma classe de rafts lipídicas consiste em esfingolipídeos e colesterol com um conjunto de proteínas de membrana ligadas ao GPI ou a várias porções de acila de ácidos graxos de cadeia longa.
- As caveolinas são proteínas integrais de membrana que se associam com a face interna da membrana plasmática, formando uma curva para dentro e, assim, formando o cavéolo, que, por sua vez, está envolvido no transporte através da membrana, na sinalização e na expansão da membrana plasmática.
- Proteínas específicas contendo domínios BAR causam curvaturas locais na membrana e controlam a fusão de duas membranas, que acompanha processos como a endocitose, a exocitose e a invasão viral. Uma vez que PIP_2 e PIP_3 são reconhecidos especificamente por proteínas BAR, as suas formações podem ser um sinal para processos intracelulares que necessitam que a membrana tenha uma curvatura.
- As SNAREs são proteínas de membrana que agem na fusão de vesículas com a membrana plasmática em resposta a algum sinal.
- Integrinas, caderinas e selectinas são proteínas transmembrana da membrana plasmática que agem ligando as células umas às outras e levando mensagens entre a matriz extracelular e o citoplasma.

11.3 Transporte de solutos através da membrana

Toda célula deve tomar das suas redondezas os materiais brutos para a biossíntese e a produção de energia e liberar os subprodutos do metabolismo para o ambiente. Esses processos necessitam que compostos pequenos e íons inorgânicos atravessem a membrana plasmática. Dentro da célula eucariótica, diferentes compartimentos têm diferentes concentrações de íons e de intermediários e produtos metabólicos, que também devem atravessar membranas intracelulares em processos mediados por proteínas e altamente regulados. Apenas poucos compostos apolares podem se dissolver na bicamada lipídica e atravessar a membrana sem qualquer ajuda. Entretanto, para atravessarem membranas, todos os compostos polares e íons necessitam totalmente de proteínas específicas da membrana como carreadores. Aproximadamente 2 mil genes do genoma humano codificam para proteínas que funcionam transportando solutos através da membrana. Em alguns casos, a proteína da membrana apenas facilita a difusão de um soluto a favor do gradiente de concentração, mas o transporte também pode ocorrer contra um gradiente de concentração, potencial elétrico ou ambos e, nesses casos, como será visto adiante, o processo de

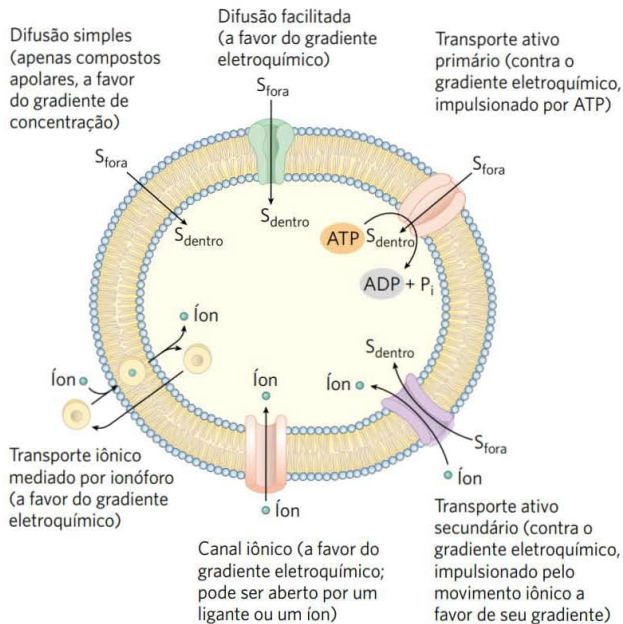


FIGURA 11-24 Resumo dos tipos de transportadores. Alguns tipos (ionóforos, canais iônicos e transportadores passivos) simplesmente aceleram o movimento do soluto através da membrana a favor do gradiente eletroquímico, ao passo que outros (transportadores ativos) podem bombear solutos contra o gradiente, usando o ATP ou o gradiente de um soluto secundário como fonte de energia.

transporte necessita de energia. Os íons também podem se mover através da membrana via canais iônicos formados por proteínas, ou podem ser transportados por ionóforos, moléculas pequenas que mascaram a carga dos íons e permitem que eles se difundam através da bicamada lipídica. A **Figura 11-24** mostra um resumo dos vários tipos de mecanismos de transporte discutidos nessa seção.

O transporte pode ser passivo ou ativo

Quando dois compartimentos aquosos contendo concentrações desiguais de um composto solúvel ou íon são separados por uma divisória permeável (membrana) o soluto se move por **difusão simples** da região de maior concentração, através da membrana, para a região de menor concentração, até que os dois compartimentos tenham concentrações iguais de soluto (**Figura 11-25a**). Quando íons de cargas opostas são separados por uma membrana permeável, exis-

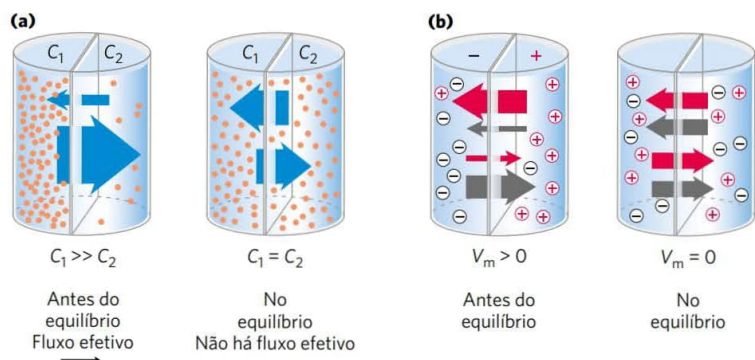
te um gradiente elétrico transmembrana, um **potencial de membrana**, V_m (expresso em milivolts). Esse potencial de membrana produz uma força que se opõe ao movimento de íons, que aumenta o V_m , e que impulsiona o movimento de íons, que reduz o V_m (**Figura 11-27b**). Assim, o sentido no qual os solutos carregados tendem a se mover espontaneamente através da membrana depende tanto do gradiente químico (a diferença na concentração de soluto) quanto do gradiente elétrico (V_m) através da membrana. Juntos, esses dois fatores são chamados de **gradiente eletroquímico** ou **potencial eletroquímico**. Esse comportamento de solutos está de acordo com a segunda lei da termodinâmica: moléculas tendem a assumir espontaneamente a distribuição de maior aleatoriedade e mais baixa energia.

As proteínas de membrana que agem aumentando a velocidade de movimento do soluto através das membranas são denominadas transportadores ou carreadores. Existem dois tipos gerais de transportadores. Os **transportadores passivos** simplesmente facilitam o movimento a favor de um gradiente de concentração, aumentando a velocidade do transporte. Esse processo é denominado **transporte passivo** ou **difusão facilitada**. Os **transportadores ativos** (algumas vezes denominados bombas) podem mover substratos através da membrana contra um gradiente de concentração ou um potencial elétrico, processo denominado **transporte ativo**. Os **transportadores ativos primários** usam energia fornecida diretamente por uma reação química, e os **transportadores ativos secundários** acoplam o transporte de um substrato “ladeira acima” com o transporte de outro substrato “ladeira abaixo”.

Transportadores e canais iônicos possuem algumas propriedades estruturais em comum, mas têm mecanismos de ação diferentes

Para atravessar a bicamada lipídica, um soluto polar ou carregado deve primeiro abandonar as interações com as moléculas de água da sua camada de hidratação e, então, difundir-se por cerca de 3 nm (30 Å) por uma substância (lipídeo) em que é muito pouco solúvel (**Figura 11-26**). A energia usada para livrar-se da camada de hidratação e para mover o composto polar da água para o lipídeo, e depois através da bicamada lipídica, é recuperada à medida que o composto deixa a membrana do outro lado e é reidratado. Entretanto, o estágio intermediário da passagem transmembrana é um estado de alta energia comparável ao estado de transição de uma reação química catalisada por

FIGURA 11-25 Movimento de solutos através de uma membrana permeável. (a) O movimento efetivo de um soluto eletricamente neutro é dirigido para o lado de menor concentração de soluto até o equilíbrio ser alcançado. As concentrações do soluto nos lados esquerdo e direito da membrana mostrada na figura estão representadas por C_1 e C_2 . A velocidade do movimento do soluto através da membrana (indicada pelas setas) é proporcional à relação entre as concentrações (b) O movimento líquido de um soluto com carga elétrica é determinado pela combinação entre o potencial elétrico (V_m) e a relação entre as concentrações químicas (C_2/C_1) dos dois lados da membrana. O movimento de um íon através da membrana continua até que o potencial elétrico da membrana chegue a zero.



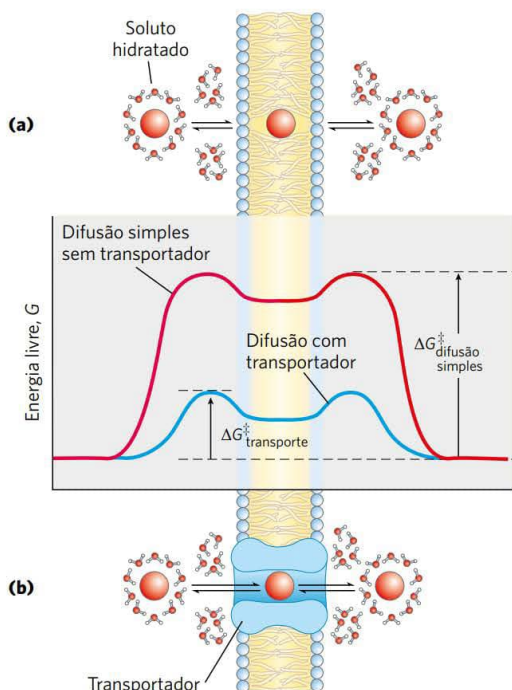


FIGURA 11-26 A variação de energia que acompanha a passagem de um soluto hidrofílico através da bicamada lipídica de uma membrana biológica. (a) Na difusão simples, a remoção da camada de hidratação é altamente endergônica, e a energia de ativação (ΔG^\ddagger) para difusão através da bicamada é muito alta. (b) Uma proteína transportadora reduz o ΔG^\ddagger para a difusão transmembrana do soluto. Isso ocorre pela formação de interações não covalentes com o soluto desidratado, pela substituição das ligações de hidrogênio existentes com moléculas de água e pelo estabelecimento de uma via hidrofílica transmembrana.

enzima. Em ambos os casos, uma barreira de ativação deve ser superada para alcançar o estado intermediário (Figura 11-26; comparar com a Figura 6-3). A energia de ativação (ΔG^\ddagger) para a translocação de um soluto polar através da bicamada é tão grande que uma bicamada lipídica pura é praticamente impermeável para espécimes polares ou carregados, dentro de uma escala de tempo compatível com o crescimento e a divisão das células.

As proteínas de membrana reduzem a energia de ativação para o transporte de compostos polares e íons ao prover um caminho alternativo para solutos específicos atravessarem a membrana. A diminuição da energia de ativação aumenta enormemente a velocidade do movimento transmembrana (retomar a Equação 6-6, p. 192). Transportadores não são enzimas no sentido usual. Os seus “substratos” são levados de um compartimento para outro, mas não são alterados quimicamente. Assim como as enzimas, os transportadores ligam-se aos seus respectivos substratos com especificidade esterequímica por meio de várias interações fracas não covalentes. A variação de energia livre associada a essas interações fracas, $\Delta G_{\text{ligação}}$, contrabalança a variação de energia livre positiva que acompanha a perda da água de solvatação do substrato, $\Delta G_{\text{desidratação}}$, e, assim, diminui ΔG^\ddagger para a passagem através da membrana (Figura 11-26). Os transportadores atravessam várias vezes a bicamada lipídica, formando uma via transmembrana revestida com cadeias laterais de aminoácidos hidrofílicos. Essas vias proporcionam rotas al-

ternativas para que um substrato específico se mova através da bicamada lipídica sem precisar se dissolver na bicamada, reduzindo o ΔG^\ddagger para a difusão transmembrana. O resultado é um aumento de várias ordens de grandeza na velocidade que um substrato passa através da membrana.

Os **canais iônicos** aumentam a velocidade da passagem de íons inorgânicos através das membranas por um mecanismo diferente do mecanismo dos transportadores. Eles fornecem um caminho aquoso através da membrana, no qual íons inorgânicos podem se difundir com altas velocidades. Muitos canais iônicos possuem um “portão” (Figura 11-27a) regulado por sinais biológicos. Quando o “portão” é aberto, os íons movem-se através da membrana por meio do canal na direção determinada pela carga do íon e do gradiente eletroquímico. O movimento ocorre com uma velocidade próxima ao limite da difusão sem obstáculos (dezenas de milhões de íons por segundo e por canal), o que é muito maior do que a velocidade de transportadores típicos. Os canais iônicos, em geral, apresentam algum grau de especificidade por um determinado íon, mas não são saturáveis pelo íon substrato. O fluxo através de um canal cessa quando o mecanismo do “portão” é fechado (novamente por um sinal biológico) ou quando já não existe mais um gradiente eletroquímico como força motora para o movimento. De modo diferente, os transportadores, que ligam seus “substratos” com alta estereoespecificidade, catalisam o transporte a velocidades bem menores do que os limites da difusão livre

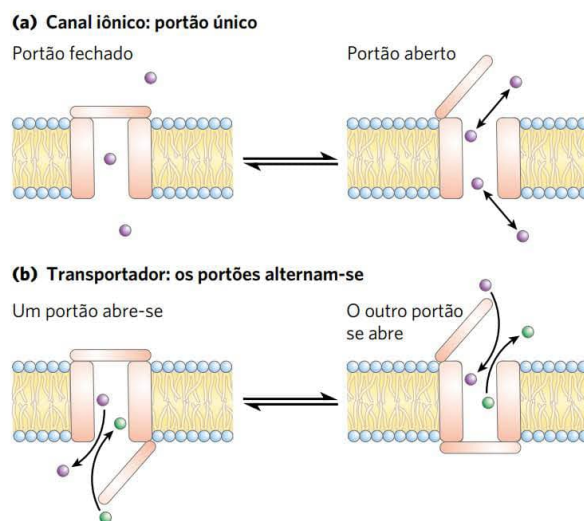


FIGURA 11-27 Diferenças entre canais e transportadores.

(a) Em um canal iônico com portão, o poro transmembrana está aberto ou fechado, dependendo da posição do único portão. Quando ele estiver aberto, os íons passam através dele com uma velocidade que é limitada apenas pela velocidade máxima de difusão. (b) Os transportadores têm dois portões e nunca os dois estão abertos ao mesmo tempo. O movimento de um substrato (um íon ou uma pequena molécula) através da membrana é, portanto, limitado pelo tempo necessário para que um portão abra e feche (em um lado da membrana) e para o segundo portão abrir. A velocidade do movimento através de canais iônicos pode ser várias ordens de grandeza maior do que a velocidade através de transportadores, mas os canais apenas possibilitam que os íons fluam na direção da diminuição do gradiente eletroquímico, ao passo que os transportadores podem mover substratos a favor ou contra (bombas) um gradiente de concentração. [Fonte: informações de D. C. Gadsby, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 10:344, 2009, Fig. 1.]

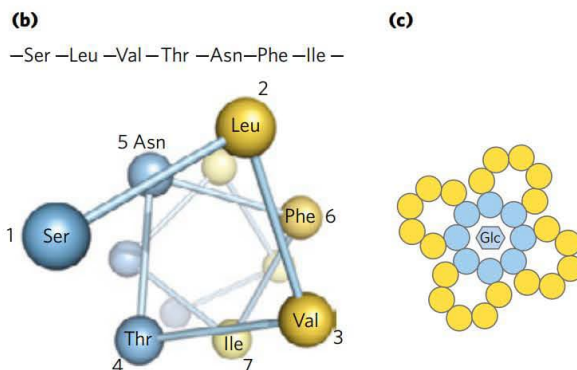
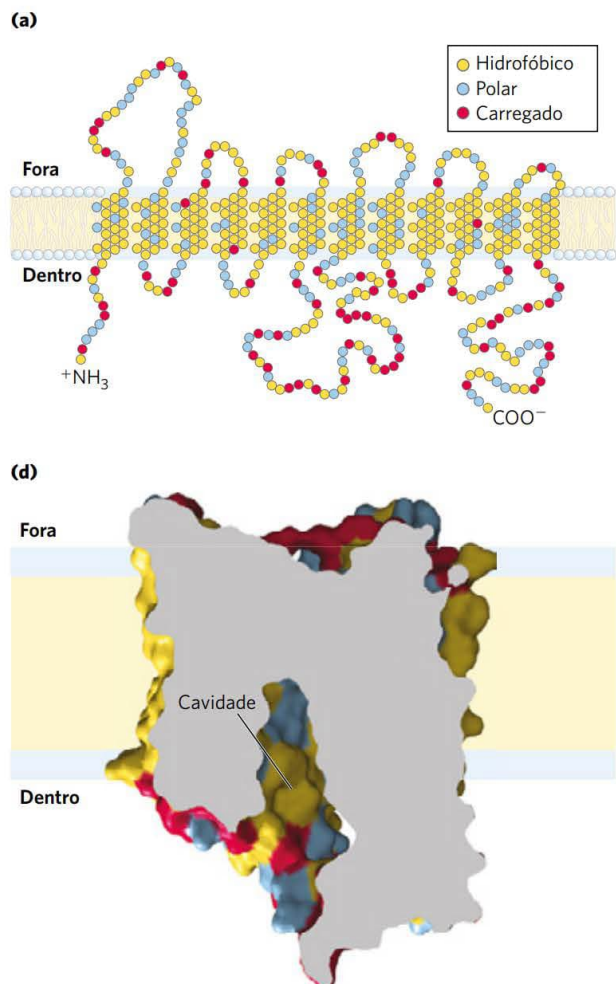


FIGURA 11-29 Topologia da membrana do transportador de glicose GLUT1.

(a) As hélices transmembrana estão representadas aqui como fileiras oblíquas (em ângulo) com três ou quatro resíduos de aminoácidos, cada fileira representa uma volta da α -hélice. Nove das doze hélices contêm três ou mais resíduos polares ou carregados (em azul ou vermelho), geralmente separados por vários resíduos hidrofóbicos (em amarelo). (b) Um diagrama de uma roda helicoidal mostra a distribuição de resíduos polares e apolares na superfície de um segmento helicoidal. A hélice é representada no diagrama como se fosse observada ao longo do eixo visto a partir de sua extremidade aminoterminal. Os resíduos adjacentes na sequência linear estão conectados, e cada resíduo é colocado ao redor da roda na posição que ocupa na hélice. Lembre-se que 3,6 resíduos são necessários para fazer uma volta completa na α -hélice. Neste exemplo, os resíduos polares (em azul) estão em um lado da hélice e os resíduos hidrofóbicos (em amarelo) estão no outro. Isso é, por definição, uma hélice anifática. (c) A associação lateral de hélices anifáticas com a face polar de cada uma orientada para a cavidade central produz um canal transmembrana revestido com resíduos polares (e carregados) disponíveis para interagirem com glicose. (d) A estrutura do GLUT1 humano na conformação aberta para dentro determinada por cristalografia por raios X. Visão de um corte da proteína mostrando a longa cavidade central aberta para o lado de dentro e revestida por muitas cadeias laterais polares. [Fontes: (a, c) informações de M. Mueckler, *Eur. J. Biochem.* 219:713, 1994. (d) PDB ID 4PYP, D. Deng et al., *Nature* 510:121, 2014.]

cose nos dois lados da membrana muito mais rapidamente do que ocorreria na ausência de um transportador específico. GLUT1 é específico para D-glicose, com valor medido de K_t de cerca de 6 mM. Para os análogos muito próximos, como D-manose e D-galactose, que diferem entre si apenas pela posição de uma hidroxila, os K_t são 20 e 30 mM, respectivamente, e para L-glicose o K_t ultrapassa 3.000 mM. Assim, GLUT1 mostra as três propriedades características do transporte passivo: alta velocidade de difusão a favor de um gradiente de concentração, saturabilidade e estereoespecificidade.

GLUT1 é uma proteína integral de membrana ($M_r \sim 56.000$) com 12 segmentos hidrofóbicos, cada um formando uma hélice que atravessa a membrana (Figura 11-29a). As hélices que se alinham para formar esse caminho para a glicose atravessar a membrana são **anifáticas**. Em cada uma das hélices, um dos lados tem resíduos predominantemente apolares, ao passo que os do outro lado são majoritariamente polares. Esta estrutura anifática está evidente no diagrama da Figura 11-29b. Um agrupamento de hélices anifáticas está organizado de modo que os lados polares ficam voltados uns para os outros e revestem um poro hidrofílico através do qual a glicose passa (Figura 11-29c), ao passo que os lados hidrofóbicos interagem com os lipídeos da membrana que estão nos arredores, de modo que o efeito hidrofóbico estabiliza toda a estrutura do transportador.

Estudos estruturais do GLUT1 de mamíferos e análogos muito semelhantes de outros organismos sugerem que a proteína passe por um ciclo de uma série de transformações, interconvertendo a forma (T_1), que tem o sítio de ligação para glicose acessível somente do lado extracelular, em uma forma na qual a glicose ligada é sequestrada e fica inacessível de qualquer dos lados e, depois, em uma forma (T_2), na qual o sítio de ligação para glicose fica aberto apenas do lado intracelular (Figura 11-30). A única forma da proteína GLUT1 humana que foi resolvida por cristalografia (Figura 11-29d) foi a forma T_2 , a forma que abre para dentro.



Doze transportadores passivos de glicose estão codificados no genoma humano, cada um com propriedades cinéticas, padrões de distribuição no tecido e funções únicos (Tabela 11-3). GLUT1, além de suprir os eritrócitos de glicose, também transporta glicose através da barreira hematoencefálica, fornecendo a glicose que é essencial para o funcionamento normal do cérebro. São muito raras as pessoas com defeitos no GLUT1. Elas apresentam vários sintomas cerebrais, incluindo tontura, disfunções no movimento e na fala e desenvolvimento retardado. O padrão de cuidados que essas pessoas devem tomar inclui uma dieta cetogênica, que fornece os corpos cetônicos que servem como fonte alternativa de energia para o cérebro (p. 668). No fígado, o GLUT2 transporta glicose para fora dos hepatócitos quando o glicogênio no

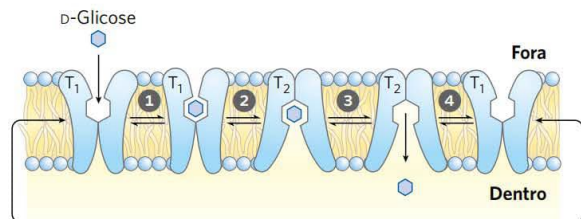


FIGURA 11-30 Modelo de transporte de glicose para dentro do eritrócito pelo GLUT1. O transportador existe em duas conformações extremas: T_1 , com o sítio de ligação à glicose exposto na superfície externa da membrana plasmática, e T_2 , com o sítio de ligação exposto na superfície interna. O transporte de glicose ocorre em quatro passos. 1 A glicose do plasma sanguíneo liga-se no sítio estereoespecífico T_1 , o que faz a energia de ativação diminuir 2 para mudar a conformação de glicose_{fora} T_1 para glicose_{dentro} T_2 , realizando a passagem da glicose pela membrana. 3 A glicose é liberada de T_2 no citoplasma e 4 o transportador volta para a conformação T_1 , ficando pronto para o transporte de uma nova molécula de glicose. Entre as formas T_1 e T_2 , há uma forma intermediária (não mostrada), na qual a glicose é sequestrada dentro do transportador e não tem acesso para nenhum dos lados.

fígado é degradado para repor a glicose sanguínea. O GLUT2 tem um K_t grande (≥ 17 mM) e pode, portanto, responder a níveis aumentados de glicose intracelular (produzidos pela degradação do glicogênio) com o aumento do transporte para fora. Os músculos esquelético e cardíaco e o tecido adiposo têm, ainda, um transportador de glicose diferente, GLUT4 ($K_t = 5$ mM), que se diferencia na resposta à insulina: a atividade aumenta quando a insulina sinaliza uma alta concentra-

ção de glicose no sangue, o que aumenta a captação de glicose pelo músculo e pelo tecido adiposo. O Quadro 11-1 descreve o efeito da insulina sobre esse transportador. ■

O trocador de cloreto-bicarbonato catalisa o cotransporte eletroneutro de ânions através da membrana plasmática

Os eritrócitos contêm outro sistema de difusão facilitada, um trocador de ânion que é essencial ao transporte de CO_2 dos tecidos, como o músculo esquelético e o fígado, para os pulmões. O CO_2 eliminado a partir da respiração dos tecidos e liberado no plasma sanguíneo entra no eritrócito, onde é convertido em bicarbonato (HCO_3^-) pela enzima anidrase carbônica. (Lembre-se que HCO_3^- é o principal tampão do pH do sangue; ver Figura 2-21.) O HCO_3^- volta ao plasma sanguíneo para ser transportado aos pulmões (Figura 11-31). Como o HCO_3^- é muito mais solúvel no plasma sanguíneo do que o CO_2 , esta via indireta aumenta a capacidade do sangue de carregar o dióxido de carbono dos tecidos aos pulmões. Nos pulmões, o HCO_3^- reentra no eritrócito e é convertido em CO_2 , quando, então, é finalmente liberado no espaço pulmonar e exalado. Para ser efetiva, esta lançadeira necessita de um movimento muito rápido do HCO_3^- através da membrana do eritrócito. (O Capítulo 5 (p. 169-171) descreve um segundo mecanismo para remover CO_2 dos tecidos para os pulmões que envolve uma ligação reversível entre o CO_2 e a hemoglobina.)

O trocador cloreto-bicarbonato, também denominado trocador de ânions (AE), aumenta a velocidade do transporte de HCO_3^- através da membrana por mais de um milhão

TABELA 11-3 Transportadores de glicose em seres humanos

Transportador	Tecido(s) onde é expresso	K_t (mM)	Papel/características ^a
GLUT1	Eritrócitos, barreira hematoencefálica, placenta, baixo nível na maioria dos tecidos	3	Captação basal de glicose; defeituoso na doença de De Vivo
GLUT2	Fígado, ilhotas do pâncreas, intestino, rim	17	No fígado e no rim, remoção do excesso de glicose do sangue; no pâncreas, regulação da liberação de insulina
GLUT3	Encéfalo (neurônio), testículo (espermatozoide)	1,4	Captação basal de glicose; alto número de renovação
GLUT4	Músculo, tecido adiposo, coração	5	Atividade aumentada pela insulina
GLUT5	Intestino (principalmente), testículo, rim	6 ^b	Transporte principalmente de frutose
GLUT6	Baço, leucócitos, encéfalo	> 5	Possivelmente sem função de transporte
GLUT7	Intestino delgado, colo, testículo, próstata	0,3	—
GLUT8	Testículo, acrossomo do espermatozoide	~ 2	—
GLUT9	Fígado, rim, intestino, pulmão, placenta	0,6	Transportador de urato e de glicose no fígado, rim
GLUT10	Coração, pulmão, encéfalo, fígado, músculo, pâncreas, placenta, rim	0,3 ^c	Transportador de glicose e de galactose
GLUT11	Coração, músculo esquelético	0,16	Transportador de glicose e de frutose
GLUT12	Músculo esquelético, coração, próstata, placenta	—	—

Fontes: informações sobre as localizações obtidas de M. Mueckler e B. Thorens, *Mol. Aspects Med.* 34:121, 2013. O valor de K_t para glicose de R. Augustin, *IUBMB Life* 62:315, 2010.

^aTraço indica incerteza sobre o papel.

^b K_m para frutose.

^c K_m para 2-desoxiglicose.

QUADRO 11-1



MEDICINA

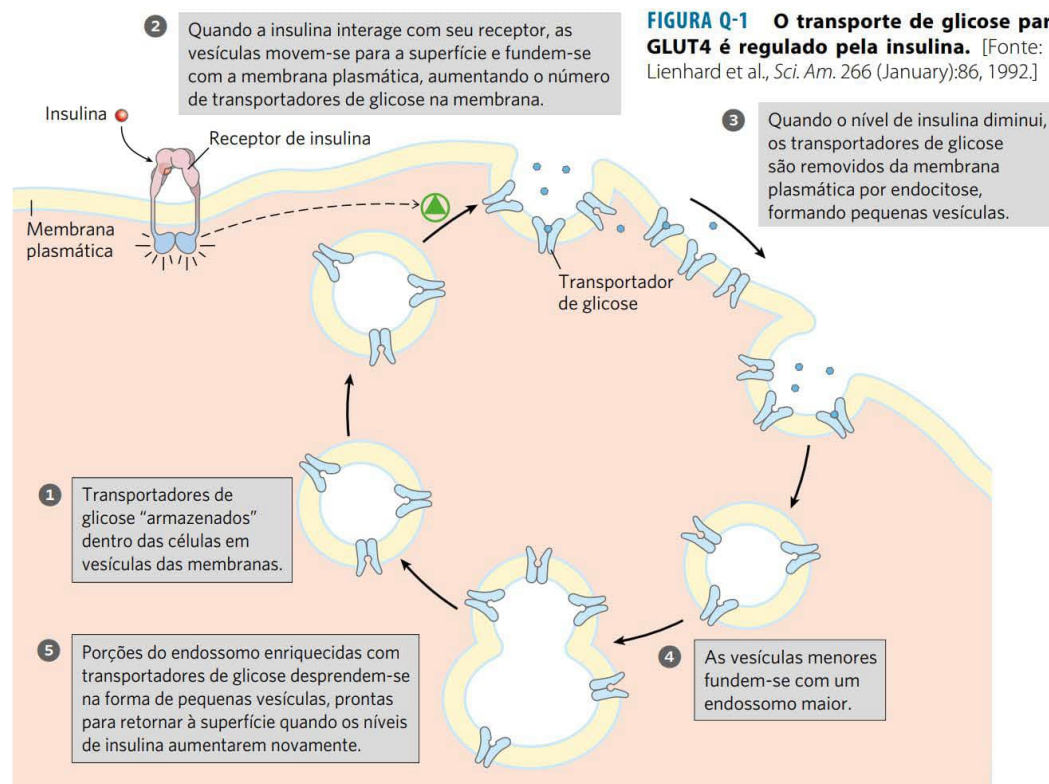
Defeito no transporte de glicose e água em duas formas de diabetes

Quando a ingestão de uma refeição rica em carboidratos gera uma concentração de glicose sanguínea que excede a concentração comumente encontrada entre as refeições (cerca de 5 mM), o excesso de glicose é captado pelos miócitos dos músculos cardíaco e esquelético (que a armazenam como glicogênio) e pelos adipócitos (que a convertem em triacilgliceróis). A captação de glicose pelos miócitos e adipócitos é mediada pelo transportador de glicose GLUT4. Nos intervalos entre as refeições, alguns GLUT4 estão presentes na membrana plasmática, mas a maioria encontra-se sequestrada nas membranas de pequenas vesículas intracelulares (Figura Q-1). A insulina liberada do pâncreas em resposta a altos níveis de glicose no sangue dispara, em minutos, a movimentação dessas vesículas para a membrana plasmática, e as vesículas fundem-se com a membrana, trazendo, assim, a maior parte das moléculas de GLUT4 para a membrana (ver Figura 12-20). Com mais moléculas de GLUT4 em ação, a velocidade de captação de glicose aumenta em 15 vezes ou mais. Quando os níveis de glicose sanguínea retornam ao normal, a liberação de insulina torna-se lenta e a maioria das moléculas de GLUT4 é removida da membrana plasmática e armazenada em vesículas.

No diabetes melito tipo I (dependente de insulina), a incapacidade de liberar insulina (e, portanto, de mobilizar transportadores de glicose) leva a baixas taxas de captação de glicose pelo músculo e pelo tecido adiposo. Uma consequência disso é que a concentração

de glicose permanece alta depois de uma refeição rica em carboidratos. Essa condição é a base para o teste de tolerância à glicose usado para diagnosticar o diabetes (Capítulo 23).

A permeabilidade à água das células epiteliais que revestem o ducto coletor renal deve-se à presença de uma aquaporina (AQP2) nas membranas plasmáticas apicais (voltadas para o lúmen do ducto). A vasopressina (hormônio antidiurético, ADH [do inglês, *antidiuretic hormone*]) regula a retenção de água pela mobilização de moléculas de AQP2 armazenadas em membranas de vesículas dentro das células epiteliais, assim como a insulina mobiliza o GLUT4 no músculo e no tecido adiposo. Quando as vesículas se fundem com a membrana plasmática das células epiteliais, a permeabilidade à água aumenta muito e mais água é reabsorvida do ducto coletor e retorna ao sangue. Quando o nível de vasopressina diminui, AQP2 é sequestrada novamente nas vesículas, reduzindo a retenção de água. No diabetes insípido, uma doença relativamente rara, um defeito genético na AQP2 leva a uma deficiência na reabsorção de água pelo rim. Isso leva à excreção de volumes copiosos de urina muito diluída. Se o indivíduo beber água o suficiente para repor o que foi perdido pela urina, não há consequências sérias do ponto de vista médico, porém a ingestão insuficiente de água leva à desidratação e ao desequilíbrio nos eletrólitos sanguíneos, o que pode levar a fadiga, dor de cabeça, dor muscular ou até mesmo à morte.



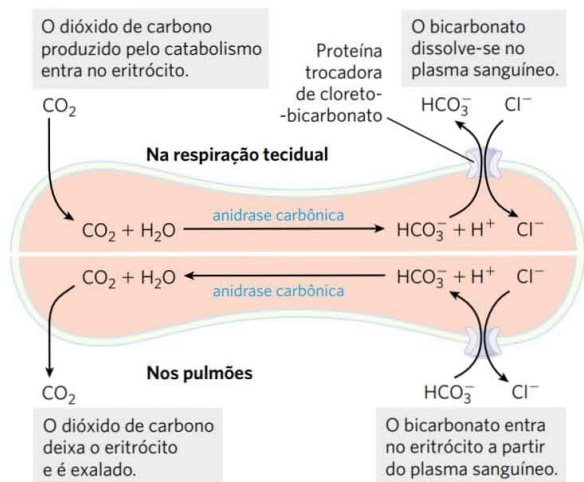


FIGURA 11-31 Trocador de cloreto-bicarbonato da membrana do eritrócito. Esse sistema de cotransporte permite a entrada e a saída de HCO_3^- sem alteração no potencial de membrana. O seu papel é aumentar a capacidade do sangue em transportar CO_2 . A metade superior da figura ilustra os eventos que ocorrem na respiração nos tecidos, e a metade inferior, os eventos que ocorrem nos pulmões.

de vezes. Assim como o transportador de glicose, ele é uma proteína integral que provavelmente atravessa a membrana pelo menos 12 vezes. Essa proteína é responsável por mediar o movimento simultâneo de dois ânions: para cada íon de HCO_3^- que se move em uma direção, um íon Cl^- move-se na direção contrária, sem transferência efetiva de carga; a troca é **eletro-neutra**. O acoplamento entre a movimentação de Cl^- e de HCO_3^- é obrigatório. Na ausência de cloreto, o transporte de bicarbonato cessa. O trocador de ânions é típico desses sistemas, chamados de **sistemas de cotransporte**, que simultaneamente carregam dois solutos através da membrana (**Figura 11-32**). Quando, como nesse caso, os dois substratos movem-se em direções opostas, o processo é **antiporte**. No **simporte**, dois substratos movem-se simultaneamente na mesma direção. Os transportadores que carregam apenas um substrato, como o transportador de glicose do eritrócito, são conhecidos como sistemas **uniporte**.

O genoma humano tem genes para três trocadores de cloreto-bicarbonato muito parecidos, todos com a mesma previsão de topologia transmembrana. Os eritrócitos contêm o transportador TA1, o TA2 é proeminente no fígado e o TA3 está presente em membranas plasmáticas no encéfalo, no coração e na retina. Trocadores de ânions semelhantes também são encontrados em plantas e microrganismos.

O transporte ativo resulta em movimento de soluto contra um gradiente de concentração ou eletroquímico

No transporte passivo, as espécies transportadas sempre se movem a favor do gradiente eletroquímico e não se acumulam para além da concentração de equilíbrio. Em contrapartida, o transporte ativo leva a um acúmulo de soluto acima do ponto de equilíbrio. O transporte ativo é essencial quando as células estiverem em um ambiente no qual os substratos-chave estão presentes fora da célula em concentrações muito pequenas. Por exemplo, a bactéria *E. coli* pode crescer em um meio contendo apenas $1 \mu\text{M}$ de P_i , mas

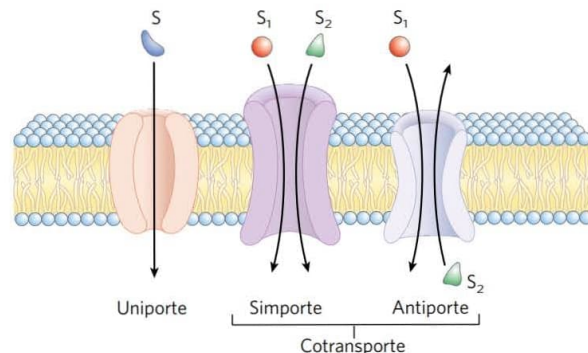


FIGURA 11-32 Três classes gerais de sistemas de transporte. Os transportadores diferem no número de solutos (substratos) transportados e na direção na qual cada soluto se move. Exemplos dos três tipos de transportadores estão discutidos no texto. Observe que essa classificação não diz nada sobre o quanto esses processos necessitam de energia (transporte ativo) ou não dependem de energia (transporte passivo).

essas células podem manter níveis internos de P_i na faixa do milimolar. (O Problema 11-2, a seguir, descreve outra situação dessas, na qual as células precisam bombear Ca^{2+} para fora através da membrana plasmática.) O transporte ativo é termodinamicamente desfavorável (endergônico) e ocorre apenas acoplado (direta ou indiretamente) a um processo exergônico, como a absorção de luz solar, uma reação de oxidação, uma hidrólise de ATP ou o fluxo concomitante de alguma outra espécie química a favor de seu gradiente eletroquímico. No transporte ativo primário, o acúmulo de soluto é acoplado diretamente a uma reação química exergônica, como na conversão de ATP a $\text{ADP} + \text{P}_i$ (**Figura 11-33**). O **transporte ativo secundário** ocorre quando o transporte endergônico (“morro acima”) de um soluto está acoplado a um fluxo exergônico (“morro abaixo”) de um soluto diferente, que era originalmente bombeado para cima pelo transporte ativo primário.

A quantidade de energia necessária para o transporte de um soluto contra o gradiente pode ser calculada a partir do

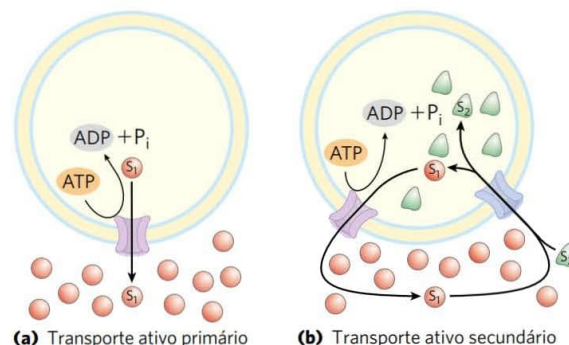


FIGURA 11-33 Dois tipos de transporte ativo. (a) No transporte ativo primário, a energia liberada pela hidrólise de ATP impulsiona o movimento de soluto (S_1) contra o gradiente eletroquímico. (b) Em um transporte ativo secundário, o gradiente de um íon (designado como S_1 ; geralmente Na^+) foi anteriormente formado por transporte ativo primário. A movimentação de S_1 a favor de seu gradiente eletroquímico fornece agora energia para impulsionar o cotransporte de um segundo soluto, S_2 , contra o seu gradiente eletroquímico.

gradiente inicial de concentração. A equação geral da variação de energia livre em um processo químico que converte o substrato (S) no produto (P) é

$$\Delta G = \Delta G'^{\circ} + RT \ln ([P]/[S]) \quad (11-2)$$

em que $\Delta G'^{\circ}$ é a variação de energia livre padrão, R é a constante dos gases (8,315 J/mol·K) e T é a temperatura absoluta. Quando a “reação” é simplesmente o transporte de um soluto de uma região onde sua concentração é C_1 para uma região onde sua concentração é C_2 , não há formação ou rompimento de ligações e $\Delta G'^{\circ}$ é zero. A variação de energia livre para o transporte, ΔG_t , então é

$$\Delta G_t = RT \ln (C_2/C_1) \quad (11-3)$$

Se houver uma diferença de 10 vezes na concentração entre dois compartimentos, o custo para movimentar 1 mol de um soluto não carregado a 25°C “morro acima” através da membrana que separa os dois compartimentos é

$$\begin{aligned} \Delta G_t &= (8,315 \text{ J/mol}\cdot\text{K})(298 \text{ K}) \ln (10/1) = 5.700 \text{ J/mol} \\ &= 5,7 \text{ kJ/mol} \end{aligned}$$

A Equação 11-3 serve para todos os solutos não carregados.

PROBLEMA 11-1 Custo de energia para bombear um soluto não carregado

Calcule o custo energético (variação de energia livre) para bombear um soluto não carregado conta um gradiente de concentração 10^4 a 2°C.

Solução: comece com a Equação 11-3. Substitua $1,0 \times 10^4$ por (C_2/C_1) , 8,315 J/mol·K por R e 298 K for T :

$$\begin{aligned} \Delta G_t &= RT \ln (C_2/C_1) \\ &= (8,315 \text{ J/mol}\cdot\text{K})(298 \text{ K})(1,0 \times 10^4) \\ &= 23 \text{ kJ/mol} \end{aligned}$$

Quando o soluto é um *íon*, o seu movimento sem o acompanhamento de um contraíon resulta em uma separação endergônica de cargas positivas e negativas, produzindo um potencial elétrico; diz-se que esse transporte é **eletrogênico**. O custo energético de mover um íon depende do potencial eletroquímico (Figura 11-25), a soma dos gradientes químico e elétrico:

$$\Delta G_t = RT \ln (C_2/C_1) + ZF\Delta\psi \quad (11-4)$$

em que Z é a carga do íon, F é a constante de Faraday (96.480 J/V·mol) e $\Delta\psi$ é o potencial elétrico transmembrana (em volts). As células eucarióticas têm potenciais de membrana plasmática geralmente da ordem de 0,05 V (sendo o lado interno negativo em relação ao externo), de modo que o segundo termo da Equação 11-4 pode contribuir significativamente na variação de energia livre total para o transporte do íon. A maioria das células mantém uma diferença de mais de 10 vezes na concentração de íons através das membranas plasmática ou intracelulares, e, para muitas células e tecidos, o transporte ativo é, portanto, o principal processo que consome energia.

PROBLEMA 11-2 Custo de energia para bombear um soluto carregado

Calcule o custo energético (variação da energia livre) para bombear Ca^{2+} do citosol, onde a concentração é cerca de $1,0 \times 10^{-7}$ M, para o líquido extracelular, onde a concentração é cerca de 1,0 mM. Suponha que a temperatura é de 37°C (a temperatura corporal de alguns mamíferos) e que a membrana plasmática tem um potencial padrão transmembrana de 50 mV (negativo no lado interno).

Solução: esse é um caso no qual deve haver gasto de energia para se contrapor a duas forças agindo sobre o íon a ser transportado: o potencial de membrana e a diferença de concentração nos dois lados da membrana. Essas forças estão expressas nos dois termos do lado direito da Equação 11-4:

$$\Delta G_t = RT \ln (C_2/C_1) + ZF\Delta\psi$$

em que o primeiro termo descreve o gradiente químico e o segundo descreve o potencial elétrico.

Na equação 11-4, substituindo-se 8,315 J/mol·K por R , 310 K por T , $1,0 \times 10^{-3}$ por C_2 , $1,0 \times 10^{-7}$ por C_1 , +2 (a carga de um íon Ca^{2+}) por Z , 96.500 J/V·mol por F e $\Delta\psi$ por 0,050V. Observe que, como o potencial transmembrana é 50 mV (negativo no lado interno), quando o íon se move de dentro para fora, a mudança no potencial é de 50 mV.

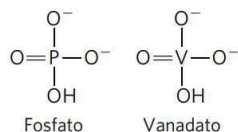
$$\begin{aligned} \Delta G_t &= RT \ln (C_2/C_1) + ZF\Delta\psi \\ &= (8,315 \text{ J/mol}\cdot\text{K})(310 \text{ K}) \ln \frac{(1,0 \times 10^{-3})}{(1,0 \times 10^{-7})} \\ &\quad + 2(96.500 \text{ J/V}\cdot\text{mol})(0,050 \text{ V}) \\ &= 33 \text{ kJ/mol} \end{aligned}$$

O mecanismo de transporte ativo é de fundamental importância na biologia. Como será visto no Capítulo 19, o ATP é formado nas mitocôndrias e nos cloroplastos por um mecanismo que é essencialmente um transporte iônico movido por ATP operando de forma reversa. A energia que é disponibilizada pelo fluxo espontâneo de prótons através da membrana pode ser calculada a partir da Equação 11-4. Lembre-se que ΔG para o fluxo *a favor* do gradiente eletroquímico tem um valor negativo e ΔG para o transporte de íons *contra* o gradiente eletroquímico tem um valor positivo.

ATPases do tipo P sofrem fosforilação durante seus ciclos catalíticos

A família de transportadores ativos, chamados de **ATPases tipo P**, são transportadores de cátions que são fosforilados de forma reversível por ATP (por isso o nome tipo P) como parte do ciclo de transporte. A fosforilação força uma mudança conformacional que é fundamental para o movimento do cátion através da membrana. O genoma humano codifica pelo menos 70 ATPases do tipo P que possuem semelhanças quanto à sequência de aminoácidos e à topologia, principalmente perto do resíduo Asp que sofre fosforilação. Todas as proteínas integrais de membrana com predição para terem em um único polipeptídeo 8 ou 10 regiões que atravessam a membrana são sensíveis à inibição pelo **vanadato**, um aná-

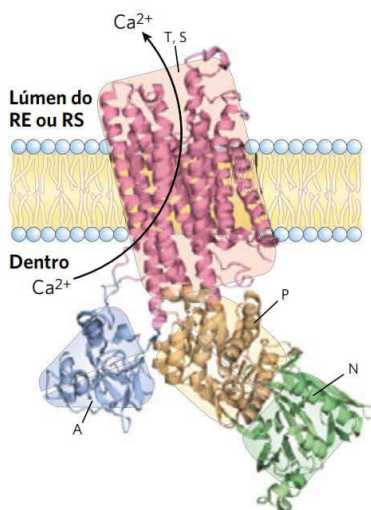
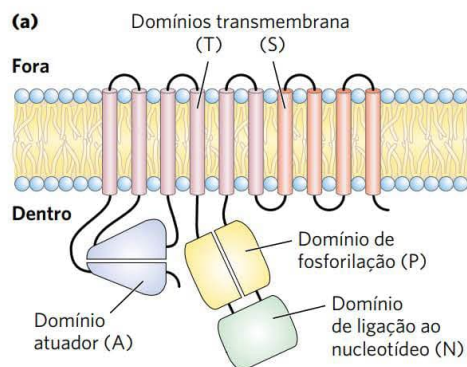
logo ao estado de transição que mimetiza um fosfato sofrendo um ataque nucleofílico por uma molécula de água.



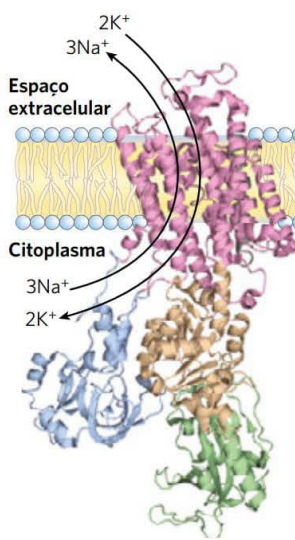
As ATPases tipo P são muito comuns em eucariotos e bactérias. A Na^+K^+ -ATPase de células animais (um

antiportador para os íons Na^+ e K^+) e as H^+ -ATPases da membrana plasmática de plantas e fungos determinam o potencial eletroquímico transmembrana nas células ao estabelecerem gradientes iônicos através da membrana. Esses gradientes proporcionam a força propulsora para o transporte ativo secundário e formam a base da sinalização elétrica em neurônios. Nos tecidos animais, a **bomba Ca^{2+} -ATPase (SERCA) do retículo endoplasmático** e a Ca^{2+} -ATPase da membrana plasmática são uniportadores que, juntos, mantêm os níveis de íons Ca^{2+} abaixo de $1\ \mu\text{M}$. A bomba SERCA movimenta o Ca^{2+} do citosol para o lúmen do retículo sarcoplasmático. As células parietais que revestem o estômago dos mamíferos possuem uma ATPase que bombeia H^+ e K^+ de dentro das células para o lúmen do estômago e, assim, acidificam o conteúdo estomacal. As flipases lipídicas, como mencionado anteriormente, são estrutural e funcionalmente relacionadas aos transportadores do tipo P. Bactérias e eucariotos usam ATPases tipo P para bobear metais pesados tóxicos como o Cd^{2+} e o Cu^{2+} para fora das células.

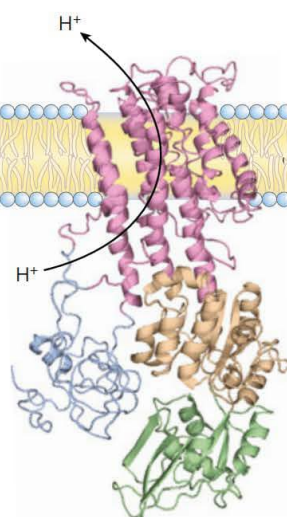
Todas as bombas do tipo P têm estruturas (**Figura 11-34**) e mecanismos semelhantes. O mecanismo postulado para as ATPases tipo P leva em consideração as grandes



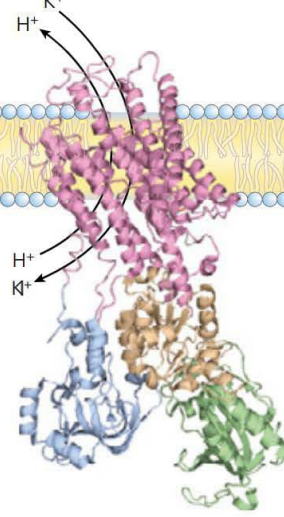
(b) Ca^{2+} ATPase (bomba SERCA)



(c) Na^+K^+ ATPase

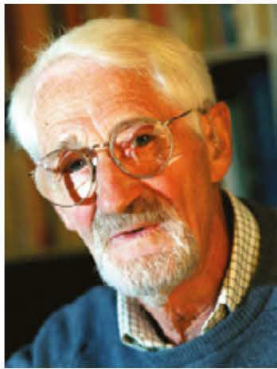
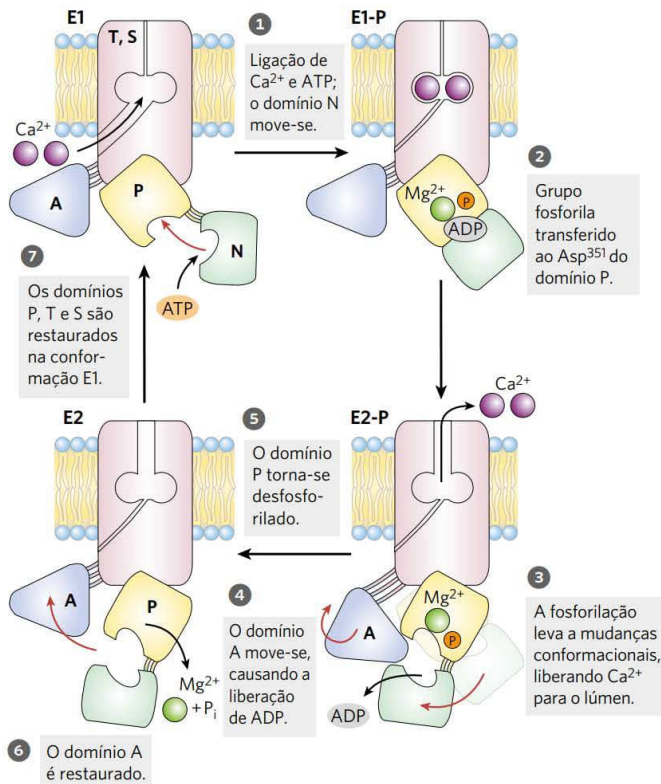


H^+ ATPase da membrana plasmática



H^+K^+ ATPase gástrica

FIGURA 11-34 Estrutura geral das ATPases tipo P. (a) As ATPases tipo P possuem três domínios citoplasmáticos (A, N e P) e dois domínios transmembrana (T e S) que são formados por várias hélices. O domínio N (liga nucleotídeos) liga ATP e Mg^{2+} e tem atividade de proteína-cinase que fosforila resíduos específicos de Asp em domínios P (fosforilação) encontrados em todas as ATPases tipo P. O domínio A (atuador) possui atividade de proteína-fosfatase e remove o grupo fosforila do resíduo Asp em cada ciclo catalítico da bomba. O domínio de transporte (T), com seis hélices transmembrana, inclui a estrutura transportadora de íon, e outras quatro hélices transmembrana constituem o domínio (S), que ajuda a manter a estrutura do domínio de transporte e pode ter outra função especializada no caso de determinadas ATPases tipo P. Os sítios de ligação para os íons a serem transportados estão próximos ao meio da membrana, 40 a 50 Å do resíduo Asp fosforilado. Assim, a fosforilação-desfosforilação do Asp não afeta diretamente a ligação do íon. O domínio A transmite os movimentos dos domínios N e P para os sítios de ligação a íons. (b) Representação em fita da Ca^{2+} -ATPase (bomba SERCA). O ATP liga-se ao domínio N, e os íons Ca^{2+} a serem transportados ligam-se ao domínio T. (c) Outro tipo de ATPase tem domínios estruturais, e possivelmente mecanismos, parecidos com os da bomba SERCA. Representação da Na^+K^+ -ATPase, da H^+ -ATPase da membrana plasmática e da H^+K^+ -ATPase gástrica. [Fontes: (a) informações de M. Bublitz et al., *Curr. Opin. Struct. Biol.* 20:431, 2010, Fig. 1. (b) PDB ID 1SU4, C. Toyoshima et al., *Nature* 405:647, 2000. (c) Na^+K^+ ATPase: PDB ID 3KDP, J. Preben Morth et al., *Nature* 450:1043, 2007; H^+ ATPase: PDB ID 3B8C, B. P. Pedersen, et al., *Nature* 450:1111, 2007; H^+K^+ ATPase: modificada de PDB ID 3IXZ, K. Abe et al., *EMBO J.* 28:1637, 2009, modelo realizado a partir de PDB ID 3B8E, J. Preben Morth et al., *Nature* 450:1043, 2007.]



Jens Skou
[Fonte: Lars Moeller/AP Images.]

mudanças conformacionais e a fosforilação-desfosforilação do resíduo crítico Asp no domínio P que ocorrem durante o ciclo catalítico. Para a bomba SERCA (Figura 11-35), cada ciclo catalítico move dois íons Ca^{2+} através da membrana e converte um ATP a ADP e P_i . O ATP tem duas funções nesse mecanismo, uma catalítica e a outra modulatória. O papel da ligação do ATP seguida da transferência da fosforila à enzima é promover a interconversão de duas conformações (E1 e E2) do transportador. Na conformação E1, dois sítios de ligação do Ca^{2+} ficam expostos ao lado citosólico do RE ou do retículo sarcoplasmático e ligam o Ca^{2+} com grande afinidade. A ligação de ATP e a fosforilação do resíduo de Asp provocam uma mudança conformacional de E1 para E2, o que resulta na exposição de sítios que ligam Ca^{2+} no lado do luminal da membrana e isso faz com que haja grande redução na afinidade por Ca^{2+} , provocando a liberação de íons Ca^{2+} no lúmen. Por meio desse mecanismo, a energia liberada pela hidrólise de ATP durante um ciclo de fosforilação-desfosforilação mobiliza o Ca^{2+} através da membrana contra um grande gradiente eletroquímico.

Uma variação desse mecanismo básico é vista na **$\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{-ATPase}$** da membrana plasmática, descoberta por Jens Skou, em 1957. Esse cotransportador acopla fosforilação-desfosforilação do resíduo Asp fundamental ao movimento simultâneo, tanto de Na^+ quanto de K^+ , contra os correspondentes gradientes eletroquímicos. A $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{-ATPase}$ é responsável por manter baixa a concentração de Na^+ e alta a de K^+ na célula, em relação ao líquido extracelular (Figura 11-36). Para cada molécula de ATP convertida a ADP e P_i , o transportador desloca dois íons K^+ para dentro e três íons Na^+ para fora através da membrana plasmática. O cotrans-

FIGURA 11-35 Mecanismo postulado para a bomba SERCA.

O ciclo do transporte começa com a proteína na conformação E1, com os sítios de ligação para Ca^{2+} expostos para o citosol. Primeiro, dois íons Ca^{2+} ligam-se ao transportador e, então, o ATP liga e fosforila o Asp³⁵¹, formando E1-P. A fosforilação favorece a segunda conformação, E2-P, na qual os sítios de ligação para Ca^{2+} , agora com menor afinidade para Ca^{2+} , ficam acessíveis do outro lado da membrana (o lúmen ou o espaço extracelular) e o Ca^{2+} liberado se difunde. Por fim, E2-P é desfosforilada, e a proteína retorna à conformação E1 para outro ciclo de transporte. [Fonte: informações de W. Kühlbrandt, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5:282, 2004.]

Uma variação desse mecanismo básico é vista na **$\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{-ATPase}$** da membrana plasmática, descoberta por Jens Skou, em 1957. Esse cotransportador acopla fosforilação-desfosforilação do resíduo Asp fundamental ao movimento simultâneo, tanto de Na^+ quanto de K^+ , contra os correspondentes gradientes eletroquímicos. A $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{-ATPase}$ é responsável por manter baixa a concentração de Na^+ e alta a de K^+ na célula, em relação ao líquido extracelular (Figura 11-36). Para cada molécula de ATP convertida a ADP e P_i , o transportador desloca dois íons K^+ para dentro e três íons Na^+ para fora através da membrana plasmática. O cotrans-

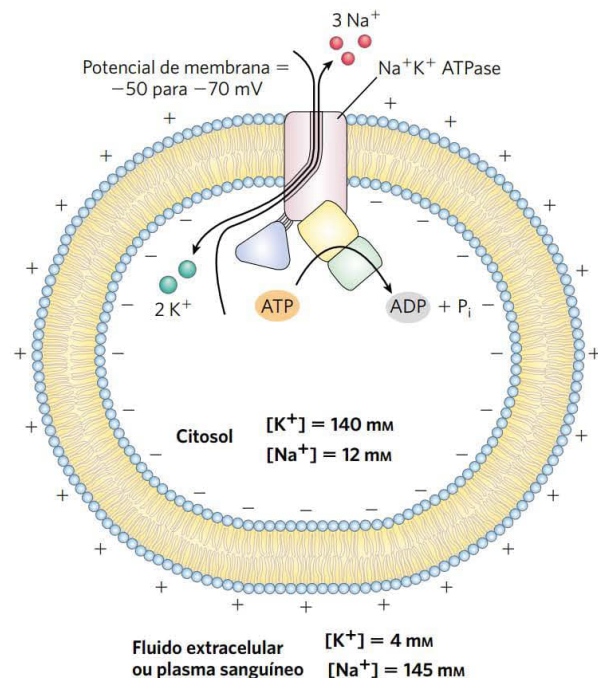


FIGURA 11-36 Papel da $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{-ATPase}$ nas células animais.

Em células animais, o sistema de transporte ativo é responsável principalmente pelo estabelecimento e pela manutenção das concentrações intracelulares de Na^+ e K^+ e pela geração do potencial de membrana. Ele ocorre devido à saída de três íons Na^+ para fora da célula para cada dois íons K^+ que entram. O potencial elétrico através da membrana plasmática é fundamental na sinalização de neurônios, e o gradiente de Na^+ é usado para impulsionar "morro acima" o cotransporte de solutos em vários tipos de células.

porte é, portanto, eletrogênico – ele cria uma separação líquida de cargas através da membrana. Em animais, isso produz o potencial de membrana de -50 a -70 mV (o lado de dentro é negativo em relação ao de fora) que é característico da maioria das células e é essencial para a condução do potencial de ação em neurônios. O papel fundamental da Na^+K^+ -ATPase é refletido na energia investida nesta única reação: aproximadamente 25% do consumo total de energia de um ser humano em repouso.

ATPases tipo V e tipo F são bombas de prótons impulsionadas por ATP

ATPases tipo V, uma das classes de ATPase transportadoras de prótons, são responsáveis por acidificar compartimentos intracelulares em muitos organismos (o V vem de vacuolar). Bombas de prótons desse tipo mantêm o pH entre 3 e 6 nos vacúolos de fungos e plantas superiores, bem abaixo do pH do citosol (pH 7,5). ATPases tipo V são também responsáveis pela acidificação de lisossomos, endossomos, do complexo de Golgi e de vesículas secretoras em células animais. Todas as ATPases tipo V apresentam uma estrutura complexa semelhante, com um domínio (V_o) integral (transmembrana) que serve como canal de prótons, e um domínio periférico (V_1) que contém o sítio de ligação para ATP e a atividade da ATPase (Figura 11-37a). A estrutura é semelhante à das ATPases tipo F já bem caracterizadas.

Os transportadores ativos **ATPases tipo F** catalisam a passagem transmembrana de prótons “morro acima” impulsionados pela hidrólise de ATP. A designação “tipo F” provém da identificação dessas ATPases com fatores para acoplamento de energia. O complexo proteico integral de

membrana F_o (Figura 11-37b; o subscrito o indica inibição pelo fármaco oligomicina) fornece uma via transmembrana para prótons e a proteína periférica F_1 (o subscrito 1 indica que esse foi o primeiro entre vários fatores isolados da mitocôndria) usa a energia do ATP para mover prótons “morro acima” (para uma região de maior concentração de H^+). A organização F_oF_1 das bombas de prótons deve ter se desenvolvido muito precocemente na evolução. Bactérias como a *E. coli* usam uma ATPase F_oF_1 complexa na membrana plasmática para bombear prótons para fora e as arqueobactérias têm uma bomba de prótons semelhante, a ATPase A_oA_1 .

Como todas as enzimas, as ATPases tipo F catalisam as reações em ambas as direções. Assim, um gradiente de prótons suficientemente grande pode suprir a energia para conduzir a reação reversa, a síntese de ATP (Figura 11-37b). Quando funcionam nesse sentido, as ATPases tipo F são mais apropriadamente chamadas de **ATP-sintases**. As ATP-sintases são fundamentais para a produção de ATP na mitocôndria durante a fosforilação oxidativa e em cloroplastos durante a fotofosforilação, assim como em bactérias e arqueobactérias. O gradiente de prótons necessário para impulsionar a síntese de ATP é produzido por outros tipos de bombas de prótons, energizadas pela oxidação do substrato ou luz solar. Uma descrição mais detalhada desses processos pode ser encontrada nos Capítulos 19 e 20.

Transportadores ABC usam ATP para impulsionar o transporte ativo de uma grande variedade de substratos

Os **transportadores ABC** formam uma grande família de transportadores impulsionados por ATP que bombeiam

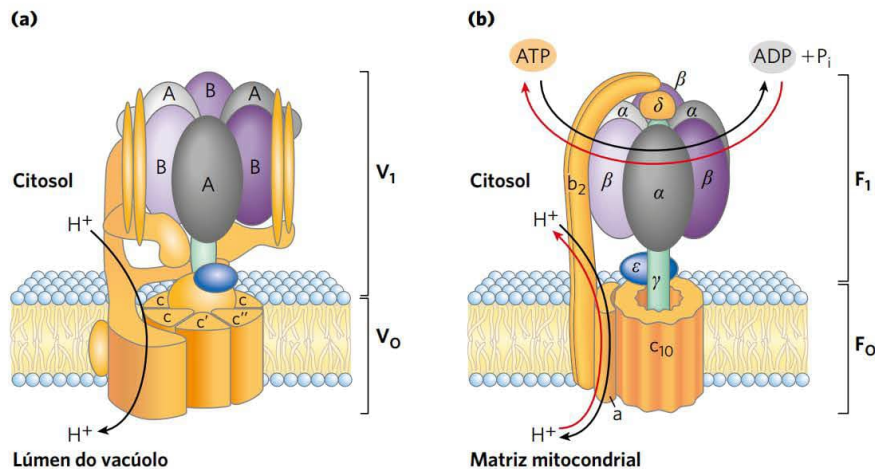


FIGURA 11-37 Duas bombas de prótons com estruturas similares. (a) A ATPase V_oV_1 H^+ utiliza ATP para bombear prótons através de vacúolos e lisossomos, criando o baixo pH interno. Ela tem um domínio integral (inserido na membrana) V_o (em cor de laranja) que inclui subunidades múltiplas idênticas e um domínio periférico que se projeta para o citosol e que contém o sítio de hidrólise de ATP localizado em três subunidades idênticas B (em roxo). (b) A_oF_1 -ATPase/ATP-sintase da mitocôndria tem um domínio integrante da membrana, F_o , com várias cópias da subunidade c e com um domínio periférico, F_1 , formado por três subunidades α , três subunidades β e um eixo central ligado ao domínio integrante da membrana. F_o e, provavelmente, V_o propiciam um canal transmembrana através do qual prótons são bombeados à medida que o ATP é hidrolisado pelas subunidades β de F_1 (subunidades B de V_1). O mecanismo notável pelo qual a hidrólise de ATP é acoplada ao movimento de prótons é descrito em detalhes no Capítulo 19. Ele envolve a rotação de F_o no plano da membrana. As estruturas da V_oV_1 -ATPase e de seus análogos, a A_oA_1 -ATPase (de arqueias) e a CF_0CF_1 -ATPase (de cloroplastos), são similares a F_oF_1 , e os mecanismos também são conservados. Um transportador de próton impulsionado por ATP também pode catalisar a síntese de ATP (setas vermelhas) à medida que prótons fluem a favor do gradiente eletroquímico. Essa é a reação central dos processos de fosforilação oxidativa e fotofosforilação, descritos detalhadamente nos Capítulos 19 e 20.

aminoácidos, peptídeos, proteínas, íons metálicos, vários lipídeos, sais biliares e muitos outros compostos hidrofóbicos, incluindo drogas, através da membrana contra um gradiente de concentração. Muitos transportadores ABC se localizam na membrana plasmática, mas alguns são também encontrados no RE e nas membranas da mitocôndria e dos lisossomos. Todos os membros dessa família possuem dois domínios de ligação para ATP (“cassetes”) e receberam os seus nomes em função disso (“*ATP-binding cassette transporters*”; transportadores com cassetes que ligam ATP) e dois domínios transmembrana, cada um formado por seis hélices transmembrana. Em alguns casos, todos esses domínios estão em um único polipeptídeo longo. Outros transportadores ABC tem duas subunidades, cada uma contribuindo com um domínio de ligação para nucleotídeo (NBD) e um domínio com seis hélices transmembrana. As estruturas das formas homólogas dos transportadores ABC do nematódeo *Caenorhabditis elegans* e da bactéria *Staphylococcus aureus* foram resolvidas (Figura 11-38) e, pensa-se, representam as duas formas extremas que a proteína assume no curso de um ciclo de transporte. Uma tem o sítio de ligação ao substrato exposto de um lado da membrana e a outra tem o sítio de ligação ao substrato do outro lado. Os substratos movem-se através da membrana quando as duas formas se interconvertem devido à hidrólise do ATP (Figura 11-38c). Os NBDs de todas as proteínas são similares quanto à sequência e, supõe-se, também quanto à estrutura tridimensional. Eles formam os motores moleculares conservados que podem ser acoplados a uma ampla variedade de domínios transmembrana, cada um capaz de bombear um substrato específico através da membrana. Quando acoplados desse jeito, o motor impulsionado por ATP move os solutos contra o gradiente de concentração com uma estequiometria de cerca de uma molécula de substrato transportado por molécula de ATP hidrolisada.



O genoma humano contém ao menos 48 genes que codificam transportadores ABC (Tabela 11-4). Alguns desses transportadores possuem especificidade muito alta por uma única molécula, ao passo que outros são mais promíscuos, sendo capazes de transportar drogas que supostamente eles nunca encontraram durante a evolução. Muitos transportadores ABC estão envolvidos na manutenção da composição da bicamada lipídica, como as flopases, que transferem lipídeos de membrana de uma lâmina da bicamada para a outra. Muitos outros são necessários para o transporte de esteróis, derivados de esteróis e ácidos graxos para a corrente sanguínea para serem transportados pelo corpo. Por exemplo, a maquinaria celular para exportar o excesso de colesterol inclui um transportador ABC (ver Figura 21-47). Mutações em genes que codificam algumas dessas proteínas contribuem para algumas doenças genéticas, incluindo falência hepática, degeneração da retina e doença de Tangier. A proteína transmembrana que regula a condutância envolvida na fibrose cística (CFTR, do inglês, *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein*) é um caso interessante de proteína ABC que é um canal (para Cl^-) regulado pela hidrólise da ATP, mas sem as características funcionais de bomba dos transportadores ativos (Quadro 11-2).

Um transportador ABC com ampla especificidade para substratos é o **transportador de vários fármacos** ou

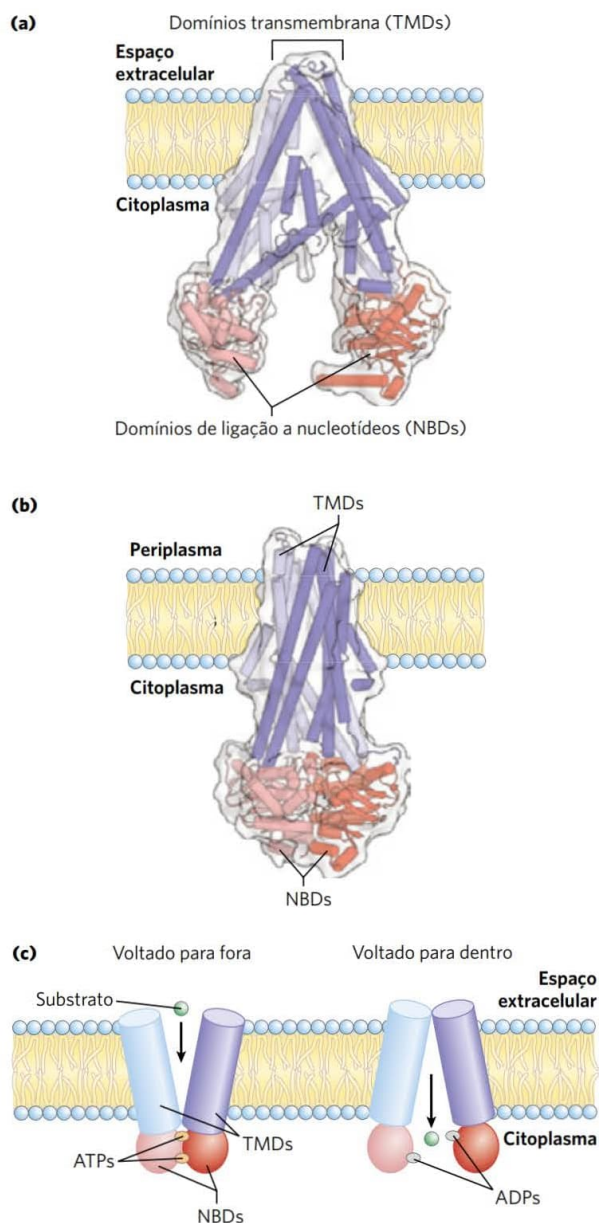


FIGURA 11-38 Transportadores ABC. (a) O transportador ABCB1 de *C. elegans*, que transporta vários fármacos, análogo ao MDE1 humano, na forma voltada para dentro. A proteína tem duas metades homólogas, cada uma delas com seis hélices transmembrana em dois domínios transmembrana (TMDs, em azul) e um domínio citoplasmático que liga nucleotídeos (NBD; em vermelho). (b) Uma proteína análoga, Sav1866, de *S. aureus* na sua possível forma voltada para fora, na qual o sítio de ligação ao substrato é acessível apenas pelo espaço extracelular. (c) Mecanismo proposto para o acoplamento da hidrólise de ATP ao transporte. O substrato liga-se ao transportador no lado extracelular, com ATP ligado nos sítios NBD. Quando o substrato se liga e o ATP é hidrolisado a ADP, há uma mudança na conformação do transportador que expõem o substrato para a superfície interna e diminui a afinidade do transportador pelo substrato; o substrato difunde-se para fora do transportador. Compare esse processo com o modelo para o transporte de glicose apresentado na Figura 11-30. [Fontes: (a) PDB ID 4F4C, M. S. Jin et al., *Nature* 490:566, 2012. (b) PDB ID 2HYD, R. J. Dawson e K. P. Locher, *Nature* 443:180, 2006.]

TABELA 11-4 Alguns transportadores ABC em seres humanos

Gene(s)	Papel/características	Texto onde é discutido
<i>ABCA1</i>	Transporte reverso de colesterol; o defeito causa doença de Tangier	pp. 851-852
<i>ABCA4</i>	Apenas em receptores da visão, exporta o todo- <i>trans</i> -retinal	p. 456, Figura 12-14
<i>ABCB1</i>	Glicoproteína-P1 de resistência múltipla a fármacos; transporte através da barreira hematoencefálica	—
<i>ABCB4</i>	Resistência múltipla a fármacos; transporte de fosfatidilcolina na bile	—
<i>ABCB6</i>	Transporte de porfirinas para a mitocôndria na síntese de heme	pp. 880-882
<i>ABCB11</i>	Transporte de sais biliares para fora dos hepatócitos	p. 650, Figura 17-1
<i>ABCC6</i>	Receptor de sulfonilureia; alvo do fármaco glipizida para diabetes tipo 2	p. 933, Figura 23-29
<i>ABCG2</i>	Proteína da resistência ao câncer de mama (BCRP); principal exportador de fármacos anticâncer	p. 418
<i>ABCG5, ABCG8</i>	Age em conjunto para limitar a captação de esteroides do estômago	—
<i>ABCC7</i>	CFTR (canal de Cl ⁻); defeito que causa a fibrose cística	p. 417; Quadro 11-2

multidrogas, MDR1, codificado pelo gene *ABCB1*. O MDR1 da membrana da placenta e da barreira hematoencefálica expulsa compostos tóxicos que poderiam causar dano ao feto ou ao cérebro. Por outro lado, ele também é o responsável pela impressionante resistência de certos tumores a fármacos anticâncer geralmente eficazes. Por exemplo, MDR1 bombeia os quimioterápicos doxorrubidina e vinblastina para fora das células, evitando que elas se acumulem no tumor e, assim, bloqueando os efeitos terapêuticos. A superexpressão de MDR1 está associada com falhas no tratamento de câncer de fígado, rim e colo. Um transportador ABC relacionado, o BCRP (do inglês, *breast cancer resistance protein* [proteína da resistência ao câncer de mama, codificada pelo gene *ABCG2*]), é superexpresso nas células de câncer de mama e confere resistência a fármacos anticâncer. Espera-se que inibidores altamente seletivos desses transportadores multirresistentes a fármacos aumentem o efeito de fármacos antitumorais e sejam alvo para o descobrimento e o planejamento de novos fármacos.

Os transportadores ABC também estão presentes em animais mais simples e em plantas e microrganismos. A levedura tem 31 genes que codificam transportadores ABC, a *Drosophila* tem 56, e a *E. coli*, 80, representando 2% de todo seu genoma. Imagina-se que transportadores ABC também são usados por *E. coli* e outras bactérias para importar moléculas essenciais, como a vitamina B₁₂, e que foram, durante a evolução, os precursores dos MDRs das células animais. A presença dos transportadores ABC que conferem resistência aos antibióticos em micróbios patogênicos (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Plasmodium falciparum*) é fator de grande preocupação em saúde pública e faz esses transportadores serem alvos interessantes para a modelagem de fármacos. ■

Os gradientes iônicos fornecem a energia necessária para o transporte ativo secundário

Os gradientes iônicos formados pelo transporte primário de Na⁺ ou H⁺ podem prover a força propulsora para o co-

transporte de outros solutos. Muitos tipos de células contêm sistemas de transporte que acoplam o fluxo espontâneo “morro abaixo” de íons ao bombeamento simultâneo “morro acima” de outro íon, açúcar ou aminoácido (Tabela 11-5).

O **transportador de lactose (lactose-permease ou galactosídeo-permease)** de *E. coli* é o protótipo bem estudado de cotransportadores impulsionados por prótons. Essa única cadeia polipeptídica (417 resíduos) transporta um próton e uma molécula de lactose para dentro da célula, com acúmulo de lactose (Figura 11-39). *E. coli* normalmente produz um gradiente de prótons e cargas através da membrana plasmática pela oxidação de combustíveis e usa a energia de oxidação para bombear prótons para fora. (Esse mecanismo é discutido em detalhes no Capítulo 19.)

TABELA 11-5 Sistemas de cotransporte impulsionados por gradientes de Na⁺ ou H⁺

Organismo/tecido/ tipo celular	Soluto transportado (movendo-se contra seu gradiente)	Soluto cotransportado (movendo-se a favor de seu gradiente)	Tipo de transporte
<i>E. coli</i>	Lactose	H ⁺	Simporte
	Prolina	H ⁺	Simporte
	Ácidos dicarboxílicos	H ⁺	Simporte
Intestino, rim (vertebrados)	Glicose	Na ⁺	Simporte
	Aminoácidos	Na ⁺	Simporte
Células de vertebrados (vários tipos)	Ca ²⁺	Na ⁺	Antiporte
Plantas superiores	K ⁺	H ⁺	Antiporte
Fungos (<i>Neurospora</i>)	K ⁺	H ⁺	Antiporte

QUADRO 11-2



MEDICINA

Canal iônico defeituoso na fibrose cística

A fibrose cística (FC) é uma doença hereditária grave. Nos Estados Unidos, a frequência da FC varia de 1 por 3.200 nascidos vivos na população branca até 1 em 31.000 nascidos vivos na população asiático-americana. Cerca de 5% de todos os americanos brancos são portadores, tendo uma cópia defeituosa do gene e uma normal. Apenas os indivíduos que têm as duas cópias do gene defeituoso apresentam os graves sintomas da doença; obstrução do trato gastrointestinal e do trato respiratório, o que geralmente leva a infecções bacterianas nas vias aéreas.

O gene defeituoso foi descoberto em 1989. Ele codifica para uma proteína denominada regulador da condutância transmembrana da fibrose cística, ou CFTR (do inglês, *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*). Essa proteína tem dois segmentos, cada um deles contém seis hélices transmembrana, dois domínios de ligação a nucleotídeos e uma região regulatória que conecta os dois segmentos (Figura Q-1). O CFTR é, portanto, muito semelhante a outras proteínas transportadoras ABC, exceto que funciona como um *canal iônico* (para Cl^-). O canal conduz Cl^- através da membrana plasmática quando ambos NBDs tiverem ATP ligado e se fecha quando o ATP em um dos NBDs for hidrolisado a ADP e P_i . O canal de Cl^- é ainda regulado pela fosforilação de vários resíduos de Ser no domínio regulatório, catalisado pela proteína-quinase dependente de cAMP (Capítulo 12). Quando o domínio regulatório não estiver fosforilado, o canal de Cl^- se fecha.

A deleção de um resíduo de Phe na posição 508 (uma mutação denominada F508del) é responsável por 70% dos casos de fibrose cística. O enovelamento da proteína mutante é incorreto e isso leva a que ele seja degradado

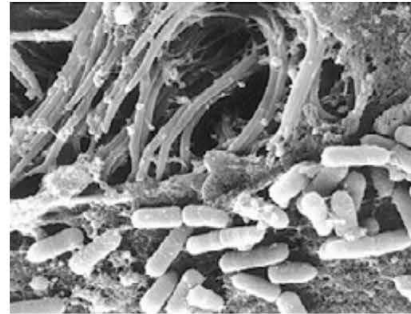


FIGURA Q-2 O muco na superfície dos pulmões aprisiona as bactérias. Em pulmões saudáveis (mostrado aqui), estas bactérias são mortas e varridas para fora pela ação dos cílios. Na fibrose cística, este mecanismo está prejudicado, resultando em infecções recorrentes e lesão progressiva dos pulmões. [Fonte: Tom Moninger, University of Iowa, Iowa City.]

nos proteassomos. Isso leva a uma redução na movimentação de Cl^- através da membrana plasmática das células epiteliais que revestem as vias aéreas, o trato digestório, as glândulas exócrinas (pâncreas, glândulas sudoríparas), dutos biliares e vaso deferente. Mutações menos comuns, como a mutação G551D (Gly⁵⁵¹ é trocado por Asp), levam à produção de CFTR, que é enovelado corretamente e se insere na membrana, mas não é capaz de transferir Cl^- .

A diminuição na exportação de Cl^- em pessoas com fibrose cística é acompanhada por uma diminuição na exportação de água pelas células, o que faz o muco da superfície celular ficar desidratado, viscoso e muito espesso. Em circunstâncias normais, os cílios das células epiteliais que revestem a superfície dos pulmões constantemente

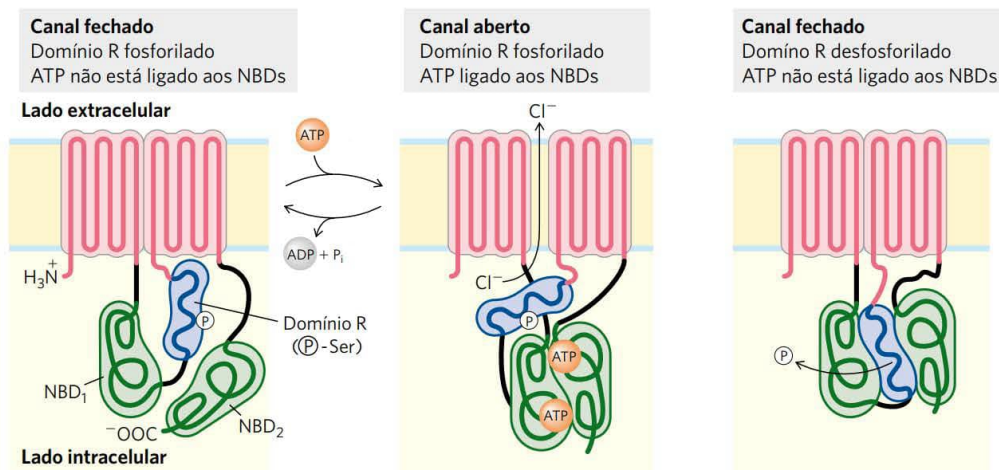


FIGURA Q-1 Os três estados da proteína CFTR. A proteína tem dois segmentos, cada qual com seis hélices transmembrana, e três domínios funcionalmente importantes se estendem a partir da superfície citoplasmática: NBD₁ e NBD₂ (em verde) são domínios com sítios de ligação a nucleotídeos que ligam ATP, e o domínio regulatório R (em azul) é o sítio de fosforilação por uma proteína-quinase dependente de cAMP. Quando esse domínio R é fosforilado, mas o ATP não se liga aos NBD (à esquerda), o canal fica fechado. A ligação do ATP abre o canal (centro) até que o ATP ligado seja hidrolisado. Quando o domínio regulatório está desfosforilado (à direita), ele liga-se ao domínio NBD e impede a ligação de ATP e a abertura do canal. O CFTR é um transportador ABC típico em tudo, exceto em dois aspectos: a maioria dos transportadores ABC não possui domínio regulatório, e o CFTR atua como um canal iônico (para Cl^-) e não como um transportador típico.

(Continua)

QUADRO 11-2



MEDICINA

Canal iônico defeituoso na fibrose cística (Continuação)

varrem as bactérias que se estabelecem nesse muco (Figura Q-2). Entretanto, o muco de pessoas com fibrose cística impede esse processo, proporcionando um paraíso para as bactérias patogênicas para o pulmão. Infecções frequentes por bactérias, como *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, causam dano progressivo aos pulmões, o que reduz a eficiência respiratória, levando à morte devido ao funcionamento inadequado dos pulmões.

Os avanços na terapia levaram a um aumento na expectativa de vida de pessoas com fibrose cística de ape-

nas 10 anos em 1960 para quase 40 anos hoje. Os potenciadores da CFTR, como ivacaftor (VX-770), aumentam a função da proteína mutante G551D, que é enovelada adequadamente e colocada na membrana plasmática. Para as pessoas com defeito no enovelamento, F508del, os fármacos que corrigem a proteína aumentam o processamento e o envio da proteína mutante para a superfície celular. Para esses pacientes, uma combinação de fármacos potenciadores e corretores é mais eficaz do que apenas o fármaco corretor (Figura Q-3).

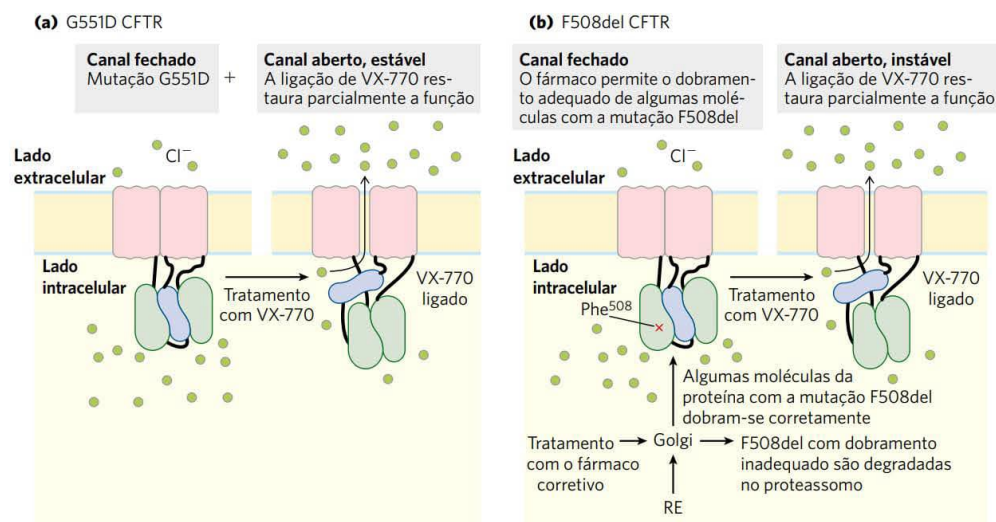


FIGURA Q-3 (a) A mutação G551D (substituição de Gly⁵⁵¹ por Asp) na CFTR leva a uma proteína que se insere na membrana corretamente, mas não funciona como canal de Cl⁻. A administração do fármaco potenciador VX-770 (ivacaftor) restaura parcialmente a função do canal de Cl⁻. (b) A mutação mais comum F508del (deleção da Phe⁵⁰⁸) impede o enovelamento correto, fazendo a proteína ser degradada nos proteossomos. Na presença de um fármaco corretor, ocorre enovelamento e inserção na membrana. A adição de um fármaco potenciador leva à recuperação parcial da atividade do canal de Cl⁻. O canal é instável e é degradado ao longo do tempo. [Fonte: informações de J. P. Clancy, *Sci. Transl. Med.* 6:1, 2014.]

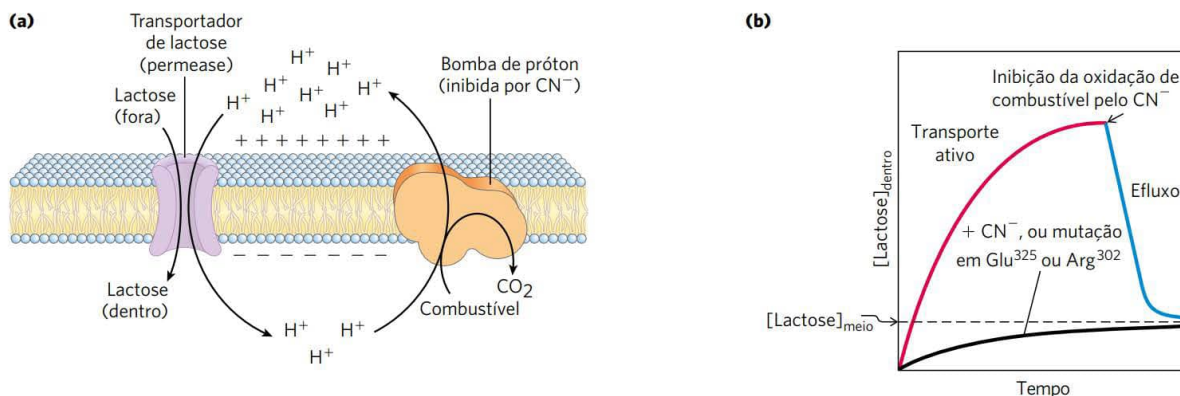


FIGURA 11-39 Captação de lactose em *E. coli*. (a) O transporte primário de H⁺ para fora da célula, impulsionado pela oxidação de uma grande variedade de combustíveis, estabelece tanto um gradiente de prótons quanto um gradiente elétrico (negativo dentro) através da membrana. O transporte ativo secundário de lactose para dentro da célula envolve o simporte de H⁺ e de lactose pelo transportador de lactose. A captação de lactose contra seu gradiente de concentração depende completamente desse influxo de prótons impulsionado pelo gradiente eletroquímico. (b) Quando as reações de oxidação do metabolismo que produzem energia são bloqueadas por cianeto (CN⁻), o transportador de lactose permite que haja equilíbrio entre as concentrações de lactose dos dois lados da membrana por transporte passivo. Mutações que afetem o Glu³²⁵ ou Arg³⁰² têm o mesmo efeito que o cianeto. A linha pontilhada representa a concentração de lactose no meio circundante.

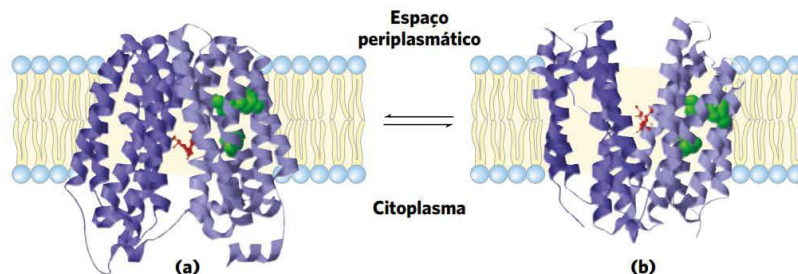


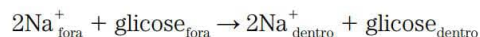
FIGURA 11-40 O transportador de lactose (lactose-permease) da *E. coli*. (a) Representação em forma de fita em uma visão paralela ao plano da membrana que mostra as 12 hélices transmembrana dispostas em dois domínios aproximadamente simétricos, em diferentes tons de roxo. Na forma da proteína de cujo cristal a estrutura foi determinada, o açúcar substrato (em vermelho) fica ligado perto do meio da membrana, onde o açúcar fica exposto ao citoplasma. (b) Segunda conformação postulada para o transportador, relacionada à estrutura anterior por uma mudança conformacional grande e reversível, na qual o sítio de ligação do substrato é exposto primeiro ao periplasma, de onde a lactose é captada, e então ao citoplasma, para onde a lactose é liberada. A interconversão das duas formas é impulsionada por mudanças no pareamento de cadeias laterais carregadas (protonáveis), como as cadeias laterais do Glu³²⁵ e da Arg³⁰² (em verde), que são afetadas pelo gradiente de prótons transmembrana. [Fontes: (a) modificada de PDB ID 1PV7, J. Abramson et al., *Science* 301:610, 2003. (b) PDB ID 2CFQ, O. Mirza et al., *EMBO J.* 25:1177, 2006.]

A membrana plasmática é impermeável a prótons, mas o transportador de lactose proporciona uma rota para a re-entrada do próton na célula e assim que isso acontece a lactose é simultaneamente levada para dentro por simporte. O acúmulo endergônico de lactose é, portanto, acoplado ao fluxo exergônico de prótons para dentro da célula, com variação de energia livre total negativa.

O transportador de lactose é um membro da **superfamília facilitadora principal (SFP)** de transportadores, que compreende 28 famílias. Quase todas as proteínas nessa superfamília têm 12 domínios transmembrana (algumas poucas exceções têm 14). As proteínas compartilham relativamente pouca homologia de sequência, mas a semelhança entre as estruturas secundárias e a topologia sugere uma estrutura com simetria aproximadamente dupla. Na forma cristalizada da proteína, uma grande cavidade aquosa é exposta no lado citoplasmático da membrana. O sítio de ligação do substrato encontra-se na cavidade, mais ou menos no centro da membrana. O lado do transportador voltado para fora (face periplasmática) é firmemente fechado, e nenhum canal é grande o suficiente para permitir a entrada de lactose. O mecanismo proposto para a passagem transmembrana do substrato (Figura 11-40b) envolve um movimento oscilatório entre os dois domínios, impulsionado pela ligação do substrato e pelo movimento dos prótons, expondo o domínio de ligação ao substrato alternativamente ao citoplasma e ao periplasma. Esse modelo é similar ao mostrado na Figura 11-30 para GLUT1.

Em células epiteliais do intestino, a glicose e certos aminoácidos são acumulados por simporte com Na⁺, a favor do gradiente de Na⁺ estabelecido pela Na⁺K⁺-ATPase da membrana plasmática (Figura 11-41). A estrutura apical das células do epitélio intestinal (a superfície voltada para o conteúdo intestinal) é coberta com microvilosidades, pro-

jeções longas e finas da membrana plasmática que fazem a área da superfície exposta ao conteúdo intestinal aumentar enormemente. O **simportador Na⁺-glicose** da membrana plasmática apical capta glicose do intestino em um processo impulsionado pelo fluxo de Na⁺ “morro abaixo”.



A energia necessária para esse processo se origina de duas fontes: a concentração de Na⁺ maior fora do que dentro (o potencial químico) e o potencial de membrana (elétrico) que é negativo dentro e, portanto, atrai Na⁺ para dentro. A grande tendência termodinâmica de o Na⁺ entrar na célula fornece a energia necessária para o transporte de glicose para dentro da célula, contra o gradiente de concentração. Assim como no caso da lactose-permease, um gradiente de íons criado e mantido por um bombeamento dependente de

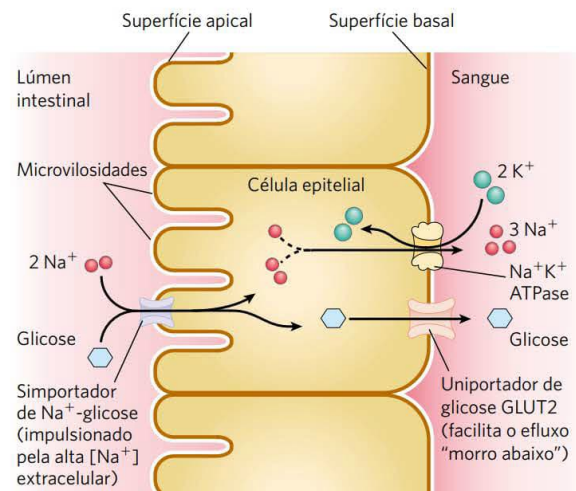


FIGURA 11-41 Transporte de glicose em células do epitélio intestinal. A glicose é cotransportada com Na⁺ para dentro da célula epitelial através da membrana plasmática apical. Ela se desloca ao longo da célula para a superfície basal, onde passa para o sangue via GLUT2, um uniportador passivo de glicose. A Na⁺K⁺-ATPase continua a bombear Na⁺ para fora para manter o gradiente de Na⁺ que impulsiona a captação de glicose.

energia serve de energia potencial para o cotransporte de uma outra espécie contra o gradiente de concentração.

PROBLEMA 11-3 Energética do bombeamento pelo simporte

Calcule a razão máxima $[\text{glicose}]_{\text{dentro}}/[\text{glicose}]_{\text{fora}}$ que pode ser alcançada pelo transportador Na^+ -glicose de uma célula epitelial quando: $[\text{Na}^+]_{\text{dentro}}$ for 12 mM, $[\text{Na}^+]_{\text{fora}}$ for 145 mM, o potencial de membrana for -50 mV (negativo do lado de dentro) e a temperatura for 37°C .

Solução: usando a Equação 11-4 (p. 413), podemos calcular a energia inerente ao gradiente eletroquímico de Na^+ – isto é, o custo para deslocar um íon Na^+ contra o seu gradiente:

$$\Delta G_t = RT \ln \frac{[\text{Na}^+]_{\text{fora}}}{[\text{Na}^+]_{\text{dentro}}} + ZF \Delta \psi$$

Substituído os valores-padrão por R , T e F ; os valores dados para $[\text{Na}^+]$ (expressos em concentração molar); $+1$ para Z (porque Na^+ tem uma carga positiva e $0,050$ V para $\Delta \psi$. Observe que o potencial de membrana é -50 mV (negativo dentro), e isso significa que, quando o íon se desloca de dentro para fora, a mudança no potencial é 50 mV.

$$\begin{aligned} \Delta G_t &= (8,315 \text{ J/mol}\cdot\text{K})(310 \text{ K}) \ln \frac{(1,45 \times 10^{-1})}{(1,2 \times 10^{-2})} + \\ &1(96.500 \text{ J/V}\cdot\text{mol})(0,050 \text{ V}) \\ &= 11,2 \text{ kJ/mol} \end{aligned}$$

Quando Na^+ reentra na célula, ele libera o potencial eletroquímico criado pelo bombeamento para fora; ΔG para a reentrada de Na^+ é $-11,2$ kJ/mol. Essa é a energia potencial por mol de Na^+ que está disponível para bombear a glicose. Dado que dois íons Na^+ se deslocam para o interior da célula a favor de seus gradientes eletroquímicos para cada glicose transportada por simporte, a energia disponível para bombear 1 mol de glicose é $2 \times 11,2 \text{ kJ/mol} = 22,4 \text{ kJ/mol}$. Agora é possível calcular a razão de concentração máxima de glicose que pode ser obtida por essa bomba (a partir da Equação 11-3, p. 413):

$$\Delta G_t = RT \ln \frac{[\text{glicose}]_{\text{fora}}}{[\text{glicose}]_{\text{dentro}}}$$

Rearranjando e substituindo os valores de ΔG_t , R e T obtêm-se

$$\begin{aligned} \ln \frac{[\text{glicose}]_{\text{fora}}}{[\text{glicose}]_{\text{dentro}}} &= \frac{\Delta G_t}{RT} = \frac{22,4 \text{ kJ/mol}}{(8,315 \text{ J/mol}\cdot\text{K})(310 \text{ K})} = 8,69 \\ \frac{[\text{glicose}]_{\text{fora}}}{[\text{glicose}]_{\text{dentro}}} &= e^{8,69} \\ &= 5,94 \times 10^3 \end{aligned}$$

Assim, o cotransportador pode bombear glicose para dentro da célula até que a concentração no interior da célula epitelial seja aproximadamente 6.000 vezes maior do que fora (no intestino). (Essa é uma razão teórica máxima, supondo um acoplamento perfeitamente eficiente de reentrada de Na^+ e de captação de glicose.)

À medida que a glicose é bombeada do intestino para a célula epitelial na superfície apical, ela é simultaneamente transferida da célula para o sangue por transporte passivo por meio do transportador de glicose (GLUT2) na superfície basal (Figura 11-41). O papel crucial do Na^+ nos sistemas de simporte e antiporte como aqui discutido requer um bombeamento constante de Na^+ para fora para manter o gradiente de Na^+ transmembrana.



No rim, um simportador Na^+ -glicose é o alvo de drogas usadas para tratar a diabetes tipo 2. Gliflozinas são inibidores específicos desse simportador Na^+ -glicose. Elas diminuem a glicemia por inibirem a reabsorção de glicose nos rins e, assim, protegem dos efeitos dos altos níveis de glicose no sangue. A glicose que não é reabsorvida pelos rins é eliminada na urina.

Devido ao papel essencial dos gradientes iônicos no transporte ativo e na conservação de energia, compostos que colapsam gradientes iônicos através da membrana são venenos eficazes e aqueles compostos que são específicos para microrganismos infecciosos podem servir como antibióticos. Uma dessas substâncias é a valinomicina, um peptídeo cíclico pequeno que neutraliza a carga do K^+ por rodear o íon com seis oxigênios de carbonilas (Figura 11-42). O peptídeo hidrofóbico age então como lançadeira, carregando o K^+ a favor de seu gradiente de concentração e diminuindo o gradiente. Compostos que lançam íons através da membrana dessa forma são chamados de **ionóforos** (transportadores de íons). Tanto a valinomicina quanto a monensina (um ionóforo carreador de Na^+) são antibióticos. Eles matam células microbianas por promoverem o desacoplamento entre o processo de transporte ativo secundário e as reações de conservação de energia. A monensina é amplamente utilizada como agente antifúngico e antiparasitário. ■

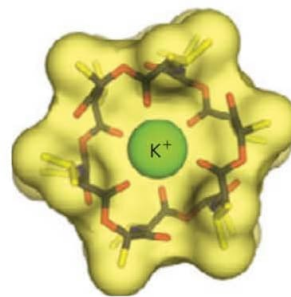


FIGURA 11-42 Valinomicina, um ionóforo peptídico que liga K^+ .

Nessa imagem, o contorno da superfície aparece como um envelope amarelo, através do qual estão visíveis uma estrutura em bastões do peptídeo e um íon de K^+ (em verde). Os átomos de oxigênio (em vermelho) que ligam K^+ fazem parte de uma cavidade hidrofílica central. Cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos (em amarelo) cobrem o lado de fora da molécula. Devido ao fato de o complexo K^+ -valinomicina ser hidrofóbico, o complexo difunde-se facilmente através das membranas, carregando K^+ a favor do gradiente de concentração. A dissipação do gradiente iônico transmembrana resultante mata as células microbianas, fazendo a valinomicina ser um antibiótico potente. [Fonte: coordenadas preparadas para The Virtual Museum of Minerals and Molecules, <http://virtual-museum.soils.wisc.edu/valinomycin/index.html>, por Phillip Barak, University of Wisconsin-Madison, Department of Soil Science, utilizando dados de K. Neupert-Laves e M. Dobler, *Helv. Chim. Acta* 58:432, 1975.]

As aquaporinas formam canais hidrofílicos transmembrana para a passagem de água

Uma família de proteínas integrais de membrana descoberta por Peter Agre, as **aquaporinas (AQP)**, provê canais para movimentos rápidos de moléculas de água através de todas



Peter Agre

[Fonte: cortesia de Dr. Peter Agre, Johns Hopkins University.]

as membranas plasmáticas. As aquaporinas são encontradas em todos os organismos, e geralmente existem muitos genes de aquaporinas, codificando proteínas similares, mas não idênticas. Onze aquaporinas são conhecidas em mamíferos, cada uma com papel e localização específicos (Tabela 11-6). Os eritrócitos, que incham e murcham rapidamente em resposta a mudanças abruptas na osmolaridade extracelular à medida que o sangue

passa pela medula renal, possuem uma membrana plasmática com alta densidade de aquaporinas (2×10^5 cópias de AQP1 por célula). As glândulas exócrinas que produzem suor, saliva e lágrimas secretam água por meio de aquaporinas. Sete aquaporinas diferentes têm funções na produção de urina e na retenção de água no néfron (a unidade fun-

cional do rim). Cada aquaporina renal tem uma localização específica no néfron, e cada uma tem propriedades e características regulatórias específicas. Por exemplo, a AQP2 das células do epitélio do ducto coletor do rim é regulada por vasopressina (também denominada hormônio antidiurético). Na presença de vasopressina, mais água é reabsorvida do ducto para os tecidos do rim. O camundongo mutante no gene da AQP2 apresenta grande eliminação de urina (poliúria) e urina mais diluída porque o túbulo proximal fica menos permeável à água. Nos seres humanos, as AQP com defeitos genéticos são conhecidas por serem responsáveis por uma grande variedade de doenças, incluindo uma forma relativamente rara de diabetes que é acompanhada por poliúria (Quadro 11-1).

As moléculas de água fluem através de um canal de AQP1 com uma velocidade de 10^9 s^{-1} . Para comparar, o número de renovação mais alto conhecido para uma enzima é o da catalase, $4 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$, sendo que muitas enzimas têm números de renovação entre 1 s^{-1} e 10^4 s^{-1} (ver Tabela 6-7). A baixa energia de ativação para a passagem de água pelos canais de aquaporina ($\Delta G^\ddagger < 15 \text{ kJ/mol}$) sugere que a água se desloca pelos canais em um fluxo contínuo, no sentido definido pelo gradiente osmótico. (Para uma discussão sobre osmose, ver p. 56.) As aquaporinas não permitem a passagem de prótons (íons hidrônio, H_3O^+), que poderiam colapsar os gradientes eletroquímicos da membrana. Qual é a base dessa seletividade extraordinária?

TABELA 11-6 Características de permeabilidade e distribuição predominante de aquaporinas conhecidas de mamíferos

Aquaporina	Permeante (permeabilidade)	Distribuição no tecido	Distribuição subcelular primária ^a
AQP0	Água (baixa)	Cristalino	Membrana plasmática
AQP1	Água (alta)	Eritrócito, rim, pulmão, endotélio vascular, encéfalo, olhos	Membrana plasmática
AQP2	Água (alta)	Rim, vaso deferente	Membrana plasmática apical, vesículas intracelulares
AQP3	Água (alta), glicerol (alto), ureia (moderada)	Rim, pele, pulmão, olhos, colo	Membrana plasmática basolateral
AQP4	Água (alta)	Encéfalo, músculo, rim, pulmão, estômago, intestino delgado	Membrana plasmática basolateral
AQP5	Água (alta)	Glândula salivar, glândula lacrimal, glândula sudorípara, pulmão, córnea	Membrana plasmática apical
AQP6	Água (baixa), ânions ($\text{NO}_3^- > \text{Cl}^-$)	Rim	Vesículas intracelulares
AQP7	Água (alta), glicerol (alto), ureia (alta)	Tecido adiposo, rim, testículo	Membrana plasmática
AQP8 ^b	Água (alta)	Testículo, rim, fígado, pâncreas, intestino delgado, colo	Membrana plasmática, vesículas intracelulares
AQP9	Água (baixa), glicerol (alto), ureia (alta)	Fígado, leucócito, encéfalo, testículo	Membrana plasmática
AQP10	Água (baixa), glicerol (alto), ureia (alta)	Intestino delgado	Vesículas intracelulares

Fonte: dados de L. S. King et al., *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5:688, 2004.

^aA membrana plasmática apical está voltada para o lúmen da glândula ou do tecido; a membrana plasmática basolateral compreende os lados e a base da célula e não está voltada para o lúmen da glândula ou do tecido.

^bAQP8 também poderia ser permeada pela ureia.

Essa resposta é encontrada na estrutura da AQP1, determinada por cristalografia por raios X. A AQP1 (**Figura 11-43a**) consiste em quatro monômeros idênticos (cada um com M_r 28.000) e cada um deles forma um poro transmembrana com um diâmetro suficiente para permitir a passagem de moléculas de água em fila única. Cada monômero tem seis segmentos helicoidais transmembrana e duas hélices menores, ambas contendo a sequência Asn-Pro-Ala (NPA). As seis hélices transmembrana formam um poro ao longo do monômero, e duas alças curtas contendo as sequências NPA se estendem, a partir de lados opostos, para o centro da bicamada. Suas regiões NPA se sobrepõem no centro da membrana para formar parte do filtro de especificidade – a estrutura que permite que apenas a água a atravesse (**Figura 11-43b**).

O canal de água estreita-se até um diâmetro de 2,8 Å próximo ao centro da membrana, restringindo severamente o tamanho das moléculas que podem passar por ali. A carga positiva de um resíduo de Arg altamente conservado nesse afunilamento impede a passagem de cátions, como o H_3O^+ . Os resíduos que revestem o canal de cada monômero de AQP1 geralmente são apolares, mas oxigênios carbonílicos no esqueleto do peptídeo, projetando-se para a parte estreita do canal em intervalos, podem fazer ligações de hidrogênio com moléculas de água individuais à medida que atravessam o canal; os dois resíduos de Asn (Asn⁷⁶ e Asn¹⁹²) nas alças NPA também formam ligações de hidrogênio com a água. A estrutura do canal não possibilita a formação de uma cadeia de moléculas de água próxima o suficiente para permitir

o salto de prótons (ver **Figura 2-14**), que poderia efetivamente movimentar prótons através da membrana. Resíduos críticos de Arg e His e dipolos elétricos formados pelas hélices curtas das alças NPA fornecem cargas positivas que repelem quaisquer prótons que poderiam vazar pelo poro, impedindo ligações de hidrogênio entre moléculas de água adjacentes.

Sabe-se que uma aquaporina isolada de espinafre tem um “portão” – aberto quando dois resíduos de Ser cruciais próximos à extremidade intracelular do canal estão fosforilados e fechado quando são desfosforilados. As duas estruturas, aberta e fechada, foram determinadas por cristalografia. A fosforilação favorece a conformação que pressiona dois resíduos de Leu próximos e um resíduo de His para o interior do canal, bloqueando o movimento de água além daquele ponto e efetivamente fechando o canal. Outras aquaporinas são reguladas de outras formas, permitindo mudanças rápidas na permeabilidade da membrana à água.

Embora em geral altamente específicas para a água, algumas AQP também permitem a passagem de glicerol ou ureia em altas taxas (**Tabela 11-6**); supõe-se que essas AQP sejam importantes no metabolismo do glicerol. A AQP7, por exemplo, encontrada em membranas plasmáticas de adipócitos (células de gordura), transporta glicerol de maneira eficiente. Supõe-se que isso seja essencial na importação de glicerol para a síntese de triacilgliceróis e para a exportação de glicerol na degradação de triacilgliceróis. Os camundongos com AQP7 defeituosa desenvolvem obesidade e diabetes não dependente de insulina.

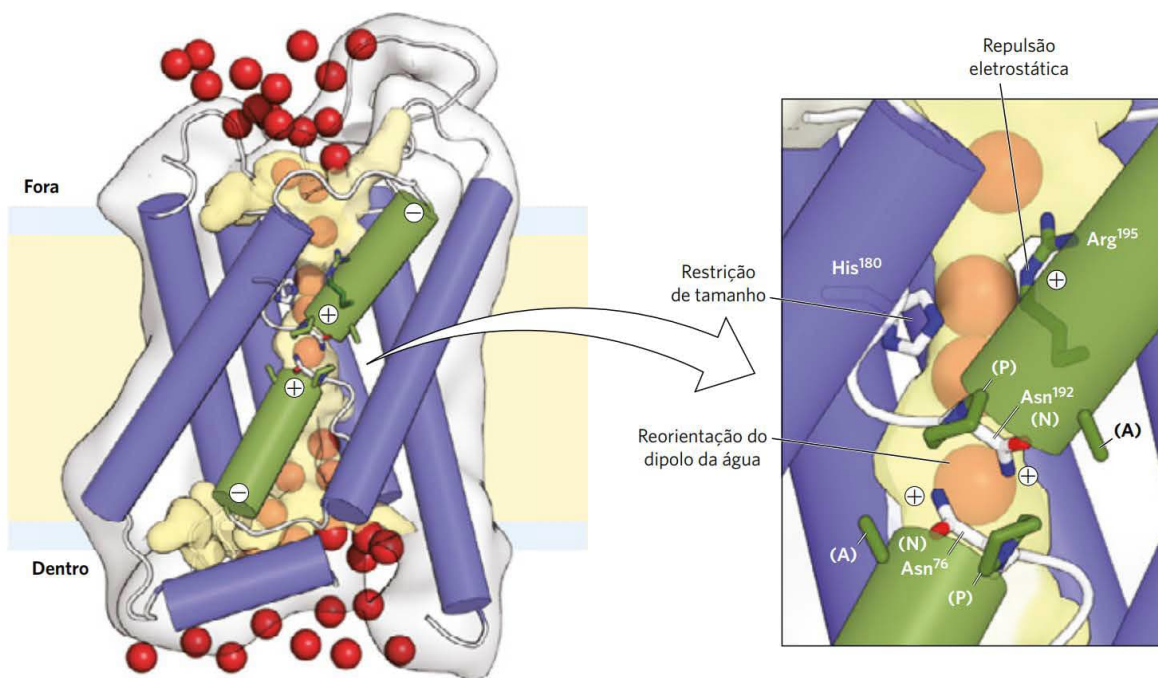


FIGURA 11-43 Aquaporina. A proteína é um tetrâmero de subunidades idênticas, cada qual com um poro transmembrana. **(a)** Monômero da aquaporina visto no plano da membrana. As hélices formam um poro central (em amarelo) pelo qual passa água (em vermelho). **(b)** Essa ampliação mostra que o poro se estreita na His¹⁸⁰ para um diâmetro de 2,8 Å, o que limita a passagem de moléculas com tamanho maior do que o da H_2O . A carga positiva do resíduo Arg¹⁹⁵ repele cátions, inclusive H_3O^+ , e isso impede que cátions passem pelo poro. As duas hélices curtas mostradas em verde contêm a sequência Asn-Pro-Ala (NPA) encontrada em aquaporinas e que faz parte do canal de água. Essas hélices estão orientadas com os dipolos com carga positiva, apontando para o poro, de modo que forçam as moléculas de água a se reorientarem quando passam por ele. Isso desmancha as ligações de hidrogênio entre cadeias laterais e moléculas de água, evitando a passagem de prótons por “salto de prótons”. [Fontes: (a) modificada de PDB ID 2B5F, S. Tornroth-Horsefield et al., *Nature* 439:688, 2006. (b) Modificada de PDB ID 1J4N, H. Sui et al., *Nature* 414:872, 2001.]

Canais iônicos seletivos permitem o movimento rápido de íons através das membranas

Canais iônicos seletivos – primeiramente verificados em neurônios e que estão presentes na membrana plasmática de todas as células, assim como nas membranas intracelulares dos eucariotos – proporcionam outro mecanismo para deslocar íons inorgânicos através da membrana. Os canais iônicos, junto com as bombas iônicas, como a $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$, determinam a permeabilidade da membrana plasmática a íons específicos e regulam a concentração citosólica de íons e o potencial de membrana. Em neurônios, mudanças muito rápidas na atividade dos canais iônicos causam mudanças no potencial de membrana (potenciais de ação) que levam sinais de uma extremidade do neurônio para a outra. Em miócitos, a abertura rápida de canais de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático libera o Ca^{2+} que desencadeia a contração muscular. As funções de sinalização de canais iônicos serão abordadas no Capítulo 12. Agora, será descrita a base estrutural para a função do canal iônico, usando exemplos como o canal de K^+ dependente de voltagem, o canal de Na^+ neuronal e o canal iônico que funciona como receptor de acetilcolina.

Os canais iônicos são diferentes dos transportadores iônicos em pelo menos três aspectos. Primeiro, a velocidade de fluxo pelos canais pode ser várias ordens de magnitude maior do que o número de renovação para o transportador – 10^7 a 10^8 íons/s para um canal iônico, aproximando-se do máximo teórico para a difusão irrestrita. Bem diferente, o número de renovação da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ é cerca de 100 s^{-1} . Segundo, os canais iônicos não são saturáveis: as velocidades não se aproximam de um máximo em concentração alta de substrato.* Terceiro, eles são disparados em resposta a

determinados tipos de eventos celulares. Em **canais dependentes de ligante** (geralmente oligoméricos), a ligação de uma pequena molécula extracelular ou intracelular força uma transição alostérica na proteína, que abre ou fecha o canal. Em **canais iônicos dependentes de voltagem**, uma mudança no potencial elétrico transmembrana (V_m) causa uma movimentação no domínio da proteína carregada em relação à membrana, abrindo ou fechando o canal. Ambos os tipos de disparo podem ser muito rápidos. Um canal geralmente se abre em uma fração de milissegundo e pode permanecer aberto durante apenas milissegundos, tornando esses dispositivos moleculares efetivos para a transmissão muito rápida de sinal no sistema nervoso.

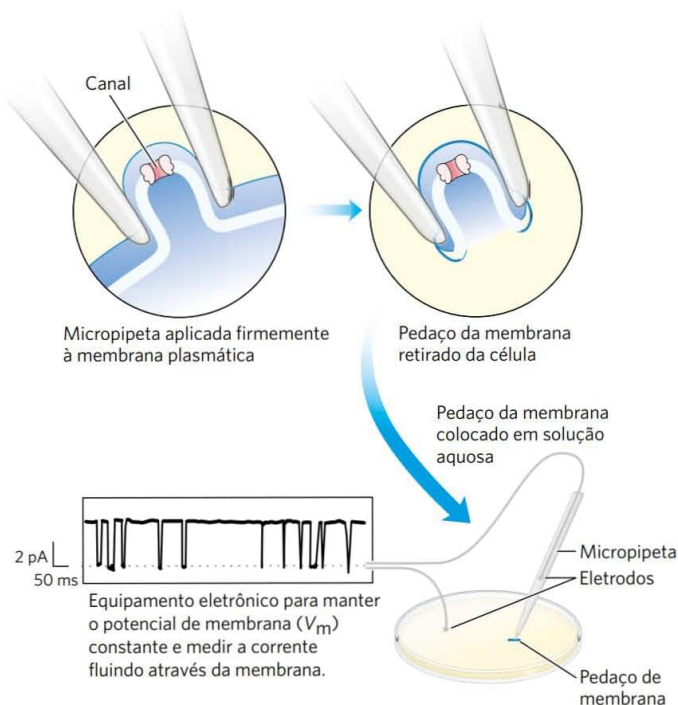
A função do canal iônico é medida eletricamente

Como um único canal iônico permanece aberto durante apenas alguns poucos milissegundos, monitorar esse processo está além do limite da maioria das técnicas bioquímicas. Portanto, fluxos iônicos devem ser medidos eletricamente, tanto como variações em V_m (na faixa de milivolt) quanto como corrente elétrica (na faixa de microampère ou picoampère) usando-se microeletrodos e amplificadores apropriados. Na técnica de **fixação de membrana** (*patch-clamping*) desenvolvida por Erwin Neher e Bert Sakmann em 1976, correntes muito pequenas são medidas através de uma região muito pequena da superfície da membrana contendo apenas uma ou poucas moléculas de canais iônicos (**Figura 11-44**). O pesquisador pode medir a intensidade e a duração da corrente que flui durante uma abertura do canal iônico e pode determinar o quão frequente o canal se abre e como essa frequência pode ser afetada pelo potencial de membrana, por ligantes regulatórios e por toxinas e outros agentes. Estudos de fixação de membrana mostraram que um número de 10^4 íons pode se deslocar por um único

*N. de R.T. nas concentrações iônicas típicas intra e extracelulares.

FIGURA 11-44 Medida elétrica da função do canal iônico.

A “atividade” de um canal iônico é estimada por meio uma medida do fluxo de íons através do canal, usando-se a técnica de fixação de membrana. Uma micropipeta é pressionada contra a superfície celular, e uma pressão negativa aplicada na pipeta forma um selamento por pressão entre a pipeta e a membrana. À medida que a pipeta é puxada da célula, ela puxa também um pedaço muito pequeno da membrana (que pode conter um ou poucos canais iônicos). Depois de colocar o pedaço da membrana mantido pela pipeta em solução aquosa, o pesquisador pode medir a atividade do canal na forma de corrente elétrica que flui entre o conteúdo da pipeta e a solução aquosa. Na prática, um circuito é montado de forma a “fixar” o potencial transmembrana em um determinado valor e, então, mede-se a corrente que deve fluir para manter essa voltagem. Com detectores de corrente altamente sensíveis, os pesquisadores podem medir a corrente que flui por um único canal iônico, geralmente de poucos picoampères. O traçado mostra a corrente através de um único canal receptor de acetilcolina em função do tempo (em milissegundos), revelando o quão rápido o canal abre e fecha, o quão frequentemente ele se abre e por quanto tempo permanece aberto. Deflexão para baixo representa abertura do canal. Fixar o V_m em valores diferentes permite determinar o efeito do potencial de membrana sobre esses parâmetros da função do canal. [Fonte: V. Witzemann et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:13,286, 1996.]



canal iônico em 1 ms. Esse fluxo iônico representa uma amplificação imensa do sinal inicial; por exemplo, apenas duas moléculas de acetilcolina são necessárias para abrir o canal receptor (como descrito a seguir).



Erwin Neher
[Fonte: cortesia de Boettcher-Gajewski/Max Planck Institut für Biophysikalische Chemie.]



Bert Sakmann
[Fonte: cortesia do Max Planck Institut für Neurobiologie.]

A estrutura do canal de K^+ revela a base da sua especificidade



Roderick MacKinnon
[Fonte: cortesia do Dr. Roderick MacKinnon, Laboratory of Molecular Neurobiology and Biophysics, The Rockefeller University.]

A estrutura do canal de potássio da bactéria *Streptomyces lividans* determinada cristalograficamente por Roderick MacKinnon em 1998, fornece informações importantes sobre como os canais iônicos funcionam. A sequência desse canal iônico de bactéria está relacionada com a de todos os outros canais de potássio conhecidos e serve como protótipo para esses canais, incluindo o canal de K^+ dependente de voltagem de neurônios. Entre os membros dessa família de

proteínas, as semelhanças nas sequências são maiores na “região do poro”, que contém o filtro de seletividade iônica que permite ao K^+ (raio de 1,33 Å) atravessar 10^4 vezes mais prontamente do que o Na^+ (raio de 0,95 Å) – a uma velocidade que se aproxima do limite teórico para difusão livre (em torno de 10^8 íons/s).

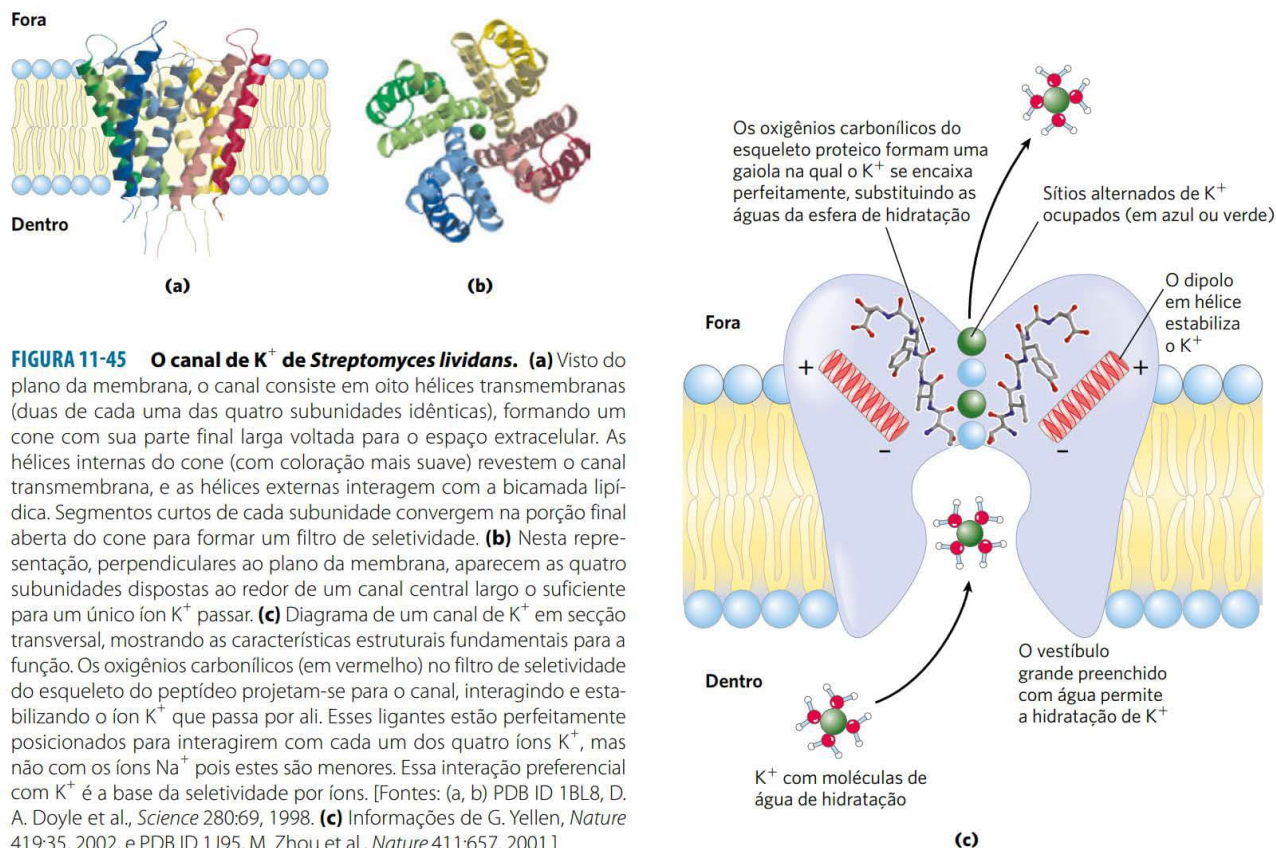
O canal de K^+ consiste em quatro subunidades idênticas que atravessam a membrana e formam um cone dentro de um cone que circunda o canal iônico, com a porção larga final do cone duplo voltada para o lado extracelular (**Figura 11-45a**). Cada subunidade tem duas α -hélices transmembrana e uma terceira hélice, mais curta, contribuindo para a região do poro. O cone externo é formado por uma das hélices transmembrana de cada subunidade. O cone interno, formado pelas outras quatro hélices transmembrana, circunda o canal iônico e cria o filtro de seletividade iônica. Visto de forma perpendicular ao plano da membrana,

fica evidente que o canal central é amplo o suficiente para acomodar um íon metálico não hidratado, como o potássio (**Figura 11-45b**).

Tanto a especificidade iônica quanto o alto fluxo através do canal são compreendidos a partir do que conhecemos da estrutura do canal (**Figura 11-45c**). Nas superfícies interna e externa da membrana plasmática, a entrada do canal tem vários resíduos de aminoácidos carregados negativamente, o que talvez aumente a concentração local de cátions, como K^+ e Na^+ . O caminho iônico através da membrana inicia (na superfície interna) como um canal largo preenchido com água, no qual o íon retém a sua esfera de hidratação. A estabilização posterior é fornecida pelas hélices curtas na região do poro de cada subunidade, com as cargas negativas parciais de seus dipolos elétricos apontando para o K^+ no canal. Em cerca de dois terços desse caminho através da membrana, esse canal estreita-se na região do filtro de seletividade, forçando o íon a abandonar as suas moléculas de água de hidratação. Os átomos de oxigênio carbonílicos no esqueleto do filtro de seletividade substituem as moléculas de água na esfera de hidratação, formando uma série perfeita de camadas de coordenação pela qual o K^+ se move. Essa interação favorável com o filtro não é possível para o Na^+ , pois ele é muito pequeno para fazer contato com todos os possíveis ligantes de oxigênio. A estabilização preferencial de K^+ é a base para a seletividade do filtro, e mutações que alteram os resíduos nessa parte da proteína eliminam a seletividade iônica do canal. Os sítios de ligação ao K^+ do filtro são flexíveis o suficiente para colapsar de forma a acomodar qualquer Na^+ que entre no canal, e essa mudança conformacional fecha o canal.

Há quatro sítios possíveis de ligação ao K^+ ao longo do filtro de seletividade, cada um composto por uma “gaiola” de oxigênio que fornece os ligantes para os íons K^+ (**Figura 11-47c**). Na estrutura cristalina, dois íons K^+ são visíveis dentro do filtro de seletividade, distantes um do outro em cerca de 7,5 Å e duas moléculas de água ocupando as posições não preenchidas. Os íons K^+ passam pelo filtro em fila única. A repulsão eletrostática mútua entre eles provavelmente equilibra a interação de cada íon com o filtro de seletividade e os mantém em movimento. O movimento de dois íons K^+ é coordenado: primeiro eles ocupam as posições 1 e 3, depois saltam para as posições 2 e 4. A diferença energética entre essas duas configurações (1, 3 e 2, 4) é muito pequena. Energeticamente, o poro de seletividade não é uma série de morros e vales, mas uma superfície plana, que é o ideal para o movimento rápido do íon através do canal. A estrutura do canal parece ter sido otimizada durante a evolução para proporcionar velocidades máximas de fluxo e alta especificidade.

Os canais de K^+ dependentes de voltagem são estruturas mais complexas do que aquela ilustrada na **Figura 11-45**, mas são variações do mesmo tema. Por exemplo, os canais de K^+ dependentes de voltagem da família *Shaker* em mamíferos possuem um canal iônico semelhante ao canal bacteriano mostrado na **Figura 11-45**, mas com um domínio proteico adicional sensível ao potencial de membrana, que se move em resposta à mudança de potencial e, ao se mover, desencadeia a abertura ou o fechamento do canal



de K^+ (Figura 11-46). A hélice transmembrana crucial no domínio sensível à voltagem dos canais de K^+ de *Shaker* contém quatro resíduos de Arg. As cargas positivas nesses resíduos fazem a hélice se mover em relação à membrana em resposta a mudanças no campo elétrico transmembrana (o potencial de membrana).

As células também têm canais que conduzem especificamente Na^+ ou Ca^{2+} e excluem K^+ . Em cada caso, a capacidade de diferenciar cátions requer tanto uma cavidade no sítio de ligação exatamente com o tamanho correto (nem muito grande nem muito pequena) para acomodar o íon, quanto o posicionamento preciso dentro da cavidade dos oxigênios carbonílicos que podem substituir a camada de hidratação dos íons. Esse ajuste pode ser conseguido com moléculas menores do que proteínas; por exemplo, a valinomicina (Figura 11-42) pode propiciar o encaixe preciso que dá alta especificidade para a ligação de um íon em vez de outro. Os químicos têm projetado moléculas pequenas com especificidade muito alta para a ligação de Li^+ (raio de 0,60 Å), Na^+ (raio de 0,95 Å), K^+ (raio de 1,33 Å) ou Rb^+ (raio de 1,48 Å). As versões biológicas, entretanto – as proteínas de canais – não apenas *ligam* especificamente, mas conduzem íons através de membranas de uma forma *controlada*.

Canais iônicos com portão são fundamentais na função neuronal

Praticamente toda a sinalização rápida entre neurônios e seus tecidos-alvo (como o músculo) é mediada pela abertura

ra e o fechamento rápido de canais iônicos nas membranas plasmáticas. Por exemplo, os canais de Na^+ em membranas plasmáticas de neurônios percebem o gradiente elétrico transmembrana e respondem a mudanças por abertura ou fechamento. Esses canais iônicos dependentes de voltagem são geralmente muito seletivos para Na^+ em relação a outros cátions mono ou divalentes (por um fator de 100 ou mais) e têm velocidades de fluxo muito altas ($> 10^7$ íons/s). Esses canais de Na^+ estão fechados quando em repouso e são abertos, ativados, quando o potencial de membrana diminui. Alguns milissegundos após a abertura, o canal fecha e permanece inativo por vários milissegundos. A ativação seguida pela inativação é a base da sinalização neuronal (ver Figura 12-29).

Outro canal iônico muito bem estudado é o **receptor nicotínico da acetilcolina**, que atua na passagem de um sinal elétrico de um neurônio motor para uma fibra muscular na junção neuromuscular (sinalizando para o músculo contrair). A acetilcolina liberada pelo neurônio motor difunde-se por apenas poucos micrômetros e atinge a membrana plasmática do miócito, onde se liga a um receptor de acetilcolina. Isso força uma mudança conformacional no receptor, causando a abertura de seu canal iônico. O movimento resultante de íons carregados positivamente para dentro do miócito despolariza a membrana plasmática e desencadeia a contração. O receptor da acetilcolina permite ao Na^+ , ao Ca^{2+} e ao K^+ atravessarem o canal com a mesma facilidade, porém outros cátions e todos os ânions são incapazes de passar. O movimento de Na^+ pelo canal iônico do receptor

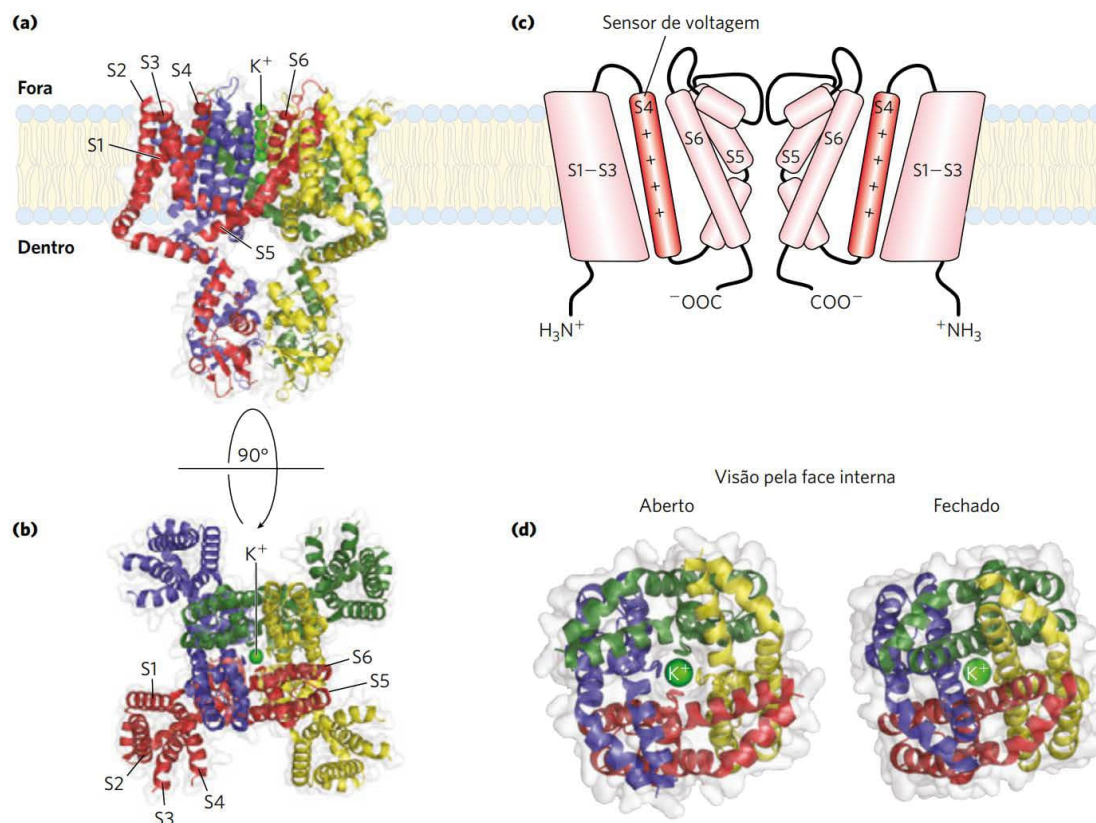
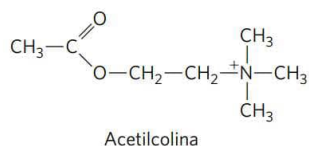


FIGURA 11-46 Bases estruturais do canal de K^+ dependente de voltagem da família de Shaker. A estrutura do cristal do complexo da subunidade $\beta 2$ (Kv1.2) de cérebro de rato mostra o canal básico K^+ (correspondendo ao mostrado na Figura 11-45) com a maquinaria adicional necessária para tornar o canal sensível ao disparo por potencial de membrana: quatro extensões de hélices transmembrana e quatro subunidades β . O complexo inteiro visto (a) no plano da membrana e (b) perpendicular ao plano (observado de fora da membrana) é representado como na Figura 11-45, com cada subunidade em uma cor diferente; cada uma das quatro subunidades β é colorida com a mesma cor da subunidade com a qual se associa. Em (b), cada hélice transmembrana de uma subunidade (em vermelho) é numerada, de S1 a S6. S5 e S6 de cada uma das quatro subunidades formam o canal propriamente dito e são comparáveis às duas hélices transmembrana de cada subunidade na Figura 11-45. S1 a S4 são quatro hélices transmembrana. A hélice S4 contém os resíduos de Arg altamente conservados, e acredita-se que seja a parte principal que se movimenta no mecanismo sensível à voltagem. (c) Um diagrama esquemático do canal dependente de voltagem, mostrando a estrutura básica do poro (centro) e as estruturas extras que tornam o canal sensível à voltagem; a hélice S4, que contém os resíduos de Arg, está em cor de laranja. Para maior clareza, as subunidades β não estão mostradas nessa figura. Na membrana em repouso, o potencial elétrico transmembrana (negativo dentro) exerce uma atração sobre as cadeias laterais das Arg carregadas positivamente em S4, em direção ao lado citosólico. Quando a membrana é despolarizada, a atração é reduzida e, com a reversão completa do potencial de membrana, S4 é empurrado em direção ao lado extracelular. (d) Esse movimento de S4 está fisicamente acoplado à abertura e ao fechamento do canal de K^+ , que está mostrado aqui em suas conformações aberta e fechada. Embora o K^+ esteja presente no canal fechado, o poro está fechando no fundo, próximo ao citosol, evitando a passagem de K^+ . [Fontes: (a, b, d) PDB ID 2A79, S. B. Long et al., *Science* 309:897, 2005. (c) Informações de C. S. Gandhi e E. Y. Isacoff, *Trends Neurosci.* 28:472, 2005.]

de acetilcolina é linear em relação à $[Na^+]$ extracelular e é muito rápido – cerca de 2×10^7 íons/s sob condições fisiológicas.



O canal receptor para a acetilcolina é típico para vários outros canais iônicos que produzem ou respondem a sinais elétricos: ele tem um “portão”, que abre em resposta à estimulação por uma molécula sinalizadora, e um mecanismo temporizador intrínseco, que fecha o portão após

uma fração de segundo. Assim, o sinal da acetilcolina é transitório, característica essencial para a condução elétrica do sinal.

Com base em semelhanças entre as sequências de aminoácidos de outros canais iônicos dependentes de ligante e o receptor da acetilcolina, os canais receptores neuronais que respondem às moléculas sinalizadoras extracelulares ácido γ -aminobutírico (GABA), glicina e serotonina são agrupados dentro da superfamília do receptor da acetilcolina e provavelmente compartilham a estrutura tridimensional e os mecanismos de portão. Os receptores GABA_A e glicina são canais aniônicos específicos para ânions Cl^- ou HCO_3^- , ao passo que o receptor da serotonina, assim como o receptor da acetilcolina, é cátion-específico.

Outra classe de canais iônicos dependentes de ligante responde a ligantes *intracelulares*: 3',5'-mononucleotídeo de guanosina cíclico (GMPc) no olho de vertebrado, GMPc e cAMP em neurônios olfativos e ATP e inositol-1,4,5-tris-fosfato (IP₃) em muitos tipos de células. Esses canais são

compostos por subunidades múltiplas, cada uma com seis domínios helicoidais transmembrana. As funções de sinalização desses canais iônicos serão discutidas no Capítulo 12.

A Tabela 11-7 mostra alguns transportadores discutidos em outros capítulos no contexto das vias onde atuam.

TABELA 11-7 Sistemas de transporte descritos em outros locais deste texto

Sistema de transporte e local	Figura	Função
Canal de Ca ²⁺ dependente de IP ₃ no RE	12-11	Permite a sinalização via alteração de [Ca ²⁺] citosólica
Transportador de glicose de membrana plasmática da célula animal; regulado pela insulina	12-20	Aumenta a capacidade dos tecidos muscular e adiposo na captação de excesso de glicose a partir do sangue
Canal de Na ⁺ dependente de voltagem	12-29	Cria potenciais de ação na transmissão neuronal de sinal
Transportador de ácidos graxos na membrana plasmática de miócito	17-3	Importa ácidos graxos para combustível
Transportador de acil-carnitina/carnitina na membrana interna da mitocôndria	17-6	Importa ácidos graxos para dentro da matriz para a β -oxidação
Transportadores de prótons dos complexos I, III e IV na membrana mitocondrial interna	19-16	Atuam como mecanismos de conservação de energia na fosforilação oxidativa, convertendo fluxo de elétrons em gradiente de prótons
ATPase F ₀ F ₁ / ATP-sintase na membrana mitocondrial interna, tilacoide do cloroplasto e membrana plasmática bacteriana	19-25, 20-20a, 20-24	Interconversão de energia do gradiente de prótons e do ATP durante a fosforilação oxidativa e a fotofosforilação
Antiportador do nucleotídeo adenina na membrana interna mitocondrial	19-30	Importa ADP, substrato para a fosforilação oxidativa, e exporta ATP, o produto
Simportador de P _i -H ⁺ na membrana mitocondrial interna	19-30	Fornecer P _i para a fosforilação oxidativa
Transportador malato- α -cetoglutarato da membrana interna da mitocôndria	19-31	Inicia o transporte de equivalentes redutores (como malato) da matriz para o citosol
Transportador glutamato-aspartato da membrana mitocondrial interna	19-31	Completa a permutação iniciada pela lançadeira malato- α -cetoglutarato
Proteína desacopladora UCP1, um poro de prótons da membrana interna da mitocôndria.	19-36, 23-35	Permite a dissipação do gradiente de prótons na mitocôndria como forma de termogênese e/ou eliminação de excesso de combustível
Complexo do citocromo <i>bf</i> , um transportador de próton da membrana tilacoide do cloroplasto	20-19	Atua como bomba de prótons, movida pelo fluxo de elétrons pelo esquema Z; fonte de gradiente de prótons para a síntese de ATP na fotossíntese
Bacteriorrodopsina, uma bomba de prótons impulsionada pela luz	20-27	É uma fonte de gradiente de prótons impulsionada pela luz para a síntese de ATP em bactérias halofílicas
Antiportador P _i -triose-fosfato na membrana interna de cloroplasto	20-42, 20-43	Exporta produto fotossintético do estroma; importa P _i para a síntese de ATP
Transportador de citrato na membrana mitocondrial interna	21-10	Fornecer citrato citosólico como fonte de acetil-CoA para a síntese de lipídeos
Transportador de piruvato na membrana mitocondrial interna	21-10	É parte do mecanismo de transporte do citrato da matriz para o citosol
Receptor LDL em membrana plasmática celular animal	21-41	Importa, por endocitose mediada por receptor, partículas que carregam lipídeo
Traslada-se proteica do RE	27-40	Transporta proteínas para o RE com destino à membrana plasmática, à secreção ou às organelas
Traslada-se proteica no poro nuclear	27-44a	Permuta proteínas entre o núcleo e o citoplasma
Transportador de proteína bacteriana	27-46	Exporta proteínas secretadas através da membrana plasmática

Canais iônicos defeituosos podem ter consequências fisiológicas graves



A importância de canais iônicos em processos fisiológicos é claramente evidenciada pela análise dos efeitos de mutações em proteínas de canais iônicos específicos (Tabela 11-8, Quadro 11-2). Defeitos genéticos em canais de Na^+ dependentes de voltagem da membrana plasmática de miócito resultam em doenças em que os músculos são periodicamente paralisados (como na paralisia periódica hipercalêmica) ou enrijecidos (como na paramiotonia congênita). A fibrose cística resulta de uma mutação que modifica um aminoácido na proteína CFTR, um canal iônico de Cl^- . Nesse caso, o processo defeituoso não é a neurotransmissão, mas a secreção por várias células de glândulas exócrinas, cujas atividades estão atreladas ao fluxo de íons Cl^- .

Muitas toxinas que ocorrem naturalmente atuam em canais iônicos, e a potência dessas toxinas ilustra a importância da função do canal iônico normal. A tetrodotoxina (produzida pelo baiacu, *Sphaeroides rubripes*) e a saxitoxina (produzida pelo dinoflagelado *Gonyaulax*, que causa as “marés vermelhas”) atuam ligando-se aos canais de Na^+ com portão dependente de voltagem em neurônios, impedindo os potenciais de ação normais. O baiacu é um ingrediente da iguaria japonesa fugu, que pode ser preparada apenas por cozinheiros especialmente treinados para separar o petisco suculento do veneno mortal. Ingerir um marisco que tenha se alimentado de *Gonyaulax* também pode ser fatal; os mariscos não são sensíveis à saxitoxina, mas ela se concentra nos músculos e isso os torna altamente venenosos para organismos situados mais acima na cadeia alimentar. O veneno da serpente mamba preta contém dendrotoxina, que interfere com os canais de K^+ dependentes de voltagem. A tubocurarina, o componente ativo do curare (usado como veneno em flechas na região amazônica) e duas outras toxinas de venenos de serpentes, a cobrotoxina e a bungarotoxina, bloqueiam o receptor da acetilcolina ou impedem a abertura de seu canal iônico. Todas essas toxinas causam paralisia e, possivelmente,

morte pelo bloqueio de sinais dos nervos para os músculos. Olhando pelo lado otimista, a afinidade extremamente alta da bungarotoxina pelo receptor da acetilcolina ($K_d = 10^{-15} \text{ M}$) tem se mostrado útil experimentalmente: a toxina radiomarcada foi usada para quantificar o receptor durante a sua purificação. ■

RESUMO 11.3 Transporte de solutos através da membrana

- O movimento de compostos polares e de íons através de membranas biológicas requer proteínas transportadoras. Alguns transportadores simplesmente facilitam a difusão passiva de um soluto através da membrana, do lado de maior para o lado de menor concentração do soluto. Outros transportam solutos contra o gradiente eletroquímico; isso requer uma fonte de energia metabólica.
- Os carreadores, da mesma forma que as enzimas, apresentam saturação e estereoespecificidade para seus substratos. O transporte via tais sistemas pode ser passivo ou ativo. O transporte ativo primário é movido por ATP ou por reações de transferência de elétrons. O transporte ativo secundário é movido pelo fluxo acoplado de dois solutos, um dos quais (geralmente H^+ ou Na^+) flui a favor de seu gradiente eletroquímico, ao passo que o outro é levado contra o seu gradiente.
- Os transportadores GLUT, como o GLUT1 dos eritrócitos, carregam glicose para dentro da célula por transporte passivo. Esses transportadores são uniportadores, carregando apenas um substrato. Os simportadores permitem a passagem simultânea de duas substâncias no mesmo sentido. Exemplos: o transportador de lactose em *E. coli*, movido pela energia de um gradiente de prótons (simporte lactose- H^+) e o transportador de glicose das células epiteliais no intestino, impulsionado pelo gradiente de Na^+ (simporte glicose- Na^+). Os antiportadores controlam a passagem simultânea de duas substâncias em sentidos opostos; exemplos são o trocador de cloreto-bicarbonato em eritrócitos e a $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase ubíqua.

TABELA 11-8 Algumas doenças resultantes de defeitos em canais iônicos

Canal iônico	Gene afetado	Doença
Na^+ (dependente de voltagem, músculo esquelético)	<i>SCN4A</i>	Paralisia periódica hipercalêmica (ou paramiotonia congênita)
Na^+ (dependente de voltagem, neuronal)	<i>SCN1A</i>	Epilepsia generalizada com crises febris
Na^+ (dependente de voltagem, músculo cardíaco)	<i>SCN5A</i>	Síndrome 3 do QT longo
Ca^{2+} (neuronal)	<i>CACNA1A</i>	Enxaqueca hemiplégica familiar
Ca^{2+} (dependente de voltagem, retina)	<i>CACNA1F</i>	Cegueira noturna estacionária congênita
Ca^{2+} (policistina 1)	<i>PKD1</i>	Doença renal policística
K^+ (neuronal)	<i>KCNQ4</i>	Surdez dominante
K^+ (dependente de voltagem, neuronal)	<i>KCNQ2</i>	Convulsões neonatais familiares benignas
Cátion não específico (portão controlado por GMPc, retinal)	<i>CNCG1</i>	Retinite pigmentosa
Receptor de acetilcolina (músculo esquelético)	<i>CHRNA1</i>	Síndrome miastênica congênita
Cl^-	<i>ABCC7</i>	Fibrose cística

- Em células animais, a Na^+K^+ -ATPase mantém as diferenças nas concentrações extracelular e citosólica de Na^+ e K^+ , e o gradiente de Na^+ resultante é usado como fonte de energia para um grande número de transporte ativo secundário.
- A Na^+K^+ -ATPase da membrana plasmática e os transportadores de Ca^{2+} dos retículos sarcoplasmático e endoplasmático (as bombas SERCA) são exemplos de ATPases do tipo P; elas sofrem fosforilação reversível durante o seu ciclo catalítico. Bombas de próton ATPases do tipo F (ATP-sintases) são fundamentais nos mecanismos de conservação de energia em mitocôndrias e cloroplastos. ATPases do tipo V produzem gradientes de prótons através de algumas membranas intracelulares, incluindo membranas de vacúolos de plantas.
- Os transportadores ABC carregam uma grande variedade de substratos (incluindo muitos fármacos) para fora das células, usando ATP como fonte de energia.
- Ionóforos são moléculas solúveis em lipídeos que ligam íons específicos e os carregam passivamente através de membranas, dissipando a energia dos gradientes eletroquímicos.
- A água atravessa a membrana pelas aquaporinas. Algumas aquaporinas são reguladas; algumas também transportam glicerol ou ureia.
- Os canais iônicos provêm poros hidrofílicos pelos quais íons selecionados podem se difundir, diminuindo seus gradientes elétricos ou químicos. Eles têm a característica de serem insaturáveis, têm velocidades de fluxo muito altas e são altamente específicos para um determinado íon. A maioria funciona com portão dependente de voltagem ou ligante. O canal de Na^+ neuronal é dependente de voltagem, e o canal iônico receptor de acetilcolina é controlado por esse neurotransmissor, o qual desencadeia mudanças conformacionais que abrem e fecham o caminho transmembrana.

Termos-chave

Termos em negrito estão definidos no glossário.

modelo do mosaico fluido 389
micela 389
bicamada 390
vesícula 390
proteínas integrais 391
 monotópico 392
 politópico 392
proteínas periféricas de membrana 392
proteínas anfitrópicas 392
 lipídeo anelar 394
índice de hidropatia 394
 barril β 395
 porina 395

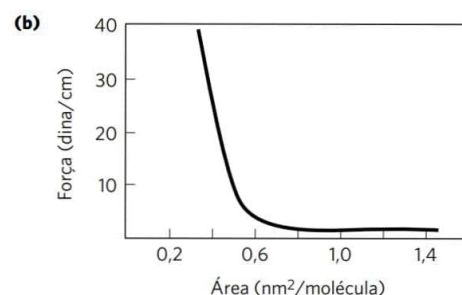
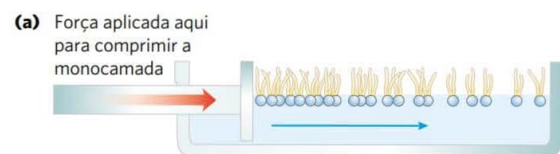
regra do positivo para dentro 395
proteína ancorada por GPI 397
 estado líquido ordenado (L_o) 397
 estado líquido desordenado (L_d) 397
flipases 399
flopases 399
flip-flopases 399
FRAP 400
 microdomínios 401
 balsas ou raftes 401
 caveolina 402
 cavéola 402

domínio BAR 403
proteína de fusão 404
v-SNARE 404
t-SNARE 404
selectinas 405
difusão simples 406
potencial de membrana (V_m) 406
gradiente eletroquímico 406
potencial eletroquímico 406
transportadores 406
transporte passivo 406
transporte ativo 406
canais iônicos 407
 K_t ($K_{\text{transporte}}$) 408
 eletroneutro 412
sistemas de cotransporte 412
antiporte 412
simporte 412
uniporte 412
eletrogênico 413

ATPases tipo P 413
 bomba SERCA 414
 Na^+K^+ -ATPase 415
 ATPases tipo V 416
 ATPases tipo F 416
ATP-sintase 416
transportadores ABC 416
transportadores de vários fármacos 417
 transportador de lactose 418
 superfamília facilitadora principal (SFP) 421
 Simportadores Na^+ -glicose 421
ionóforos 422
aquaporinas (AQP) 423
 canais dependentes de ligante 425
 canais iônicos dependentes de voltagem 425
 fixação de membrana 425
 receptor nicotínico de acetilcolina 427

Teste seu conhecimento

1. Determinando a área de seção transversal de uma molécula lipídica Quando fosfolipídeos são dispostos suavemente na superfície da água, eles orientam-se na interface ar-água com os grupos polares na água e suas caudas hidrofóbicas no ar. Um dispositivo experimental **(a)** foi criado de forma a reduzir a área da superfície disponível para uma camada de lipídeos. Medindo-se a força necessária para agrupar os lipídeos, é possível determinar quando as moléculas estão compactadas firmemente em uma monocamada contínua. Ao se aproximar dessa área, a força necessária para uma posterior redução da área da superfície aumenta repentinamente **(b)**. Como esse dispositivo poderia ser usado para determinar a área média ocupada por uma única molécula lipídica na monocamada?



2. Evidência de uma bicamada lipídica Em 1925, E. Gorter e F. Grendel usaram um dispositivo como o descrito no Problema 1 para determinar a área da superfície de uma monocamada lipídica formada pelos lipídeos extraídos de eritrócitos de várias espécies de animais. Eles usaram um microscópio para medir as dimensões das células individuais, e, a partir daí, calcularam a média da área da superfície de um eritrócito. Eles obtiveram os dados mostrados na tabela abaixo. É justificada a conclusão desses investigadores de que “os cromócitos (eritrócitos) estão cobertos por uma camada de substâncias gordurosas com espessura correspondente a duas moléculas” (i.e., a bicamada lipídica)?

Animal	Volume de células comprimidas (mL)	Número de células (por mm ³)	Área de superfície total da monocamada lipídica de células (m ²)	Área total da superfície de uma célula (μm ²)
Cachorro	40	8.000.000	62	98
Ovelha	10	9.900.000	6,0	29,8
Homem	1	4.740.000	0,92	99,4

Fonte: dados de E. Gorter e F. Grendel, *J. Exp. Med.* 41:439, 1925.

3. Número de moléculas de detergente por micela Quando uma pequena quantidade do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS; Na⁺CH₃(CH₂)₁₁OSO₃⁻) é dissolvida em água, os íons do detergente entram na solução como espécies monoméricas. À medida que mais detergente é adicionado, uma concentração é alcançada (concentração micelar crítica), na qual os monômeros se associam, formando micelas. A concentração micelar crítica de SDS é 8,2 mM. As micelas têm uma massa média de partícula (a soma das massas moleculares dos monômeros constituintes) de 18.000. Calcule o número de moléculas do detergente na micela média.

4. Propriedades dos lipídeos e das bicamadas lipídicas As bicamadas lipídicas formadas entre duas fases aquosas têm uma propriedade importante: elas formam lâminas bidimensionais, a borda de cada uma se fecha sobre a outra e elas sofrem autosselamento para formar vesículas (lipossomos).

- Que propriedades dos lipídeos são responsáveis por essa propriedade das bicamadas? Explique.
- Quais são as consequências dessa propriedade para a estrutura de membranas biológicas?

5. Comprimento da molécula de ácido graxo A distância na ligação carbono-carbono para carbonos em ligação simples, como em uma cadeia acila graxa saturada, é de cerca de 1,5 Å. Estime o comprimento de uma única molécula de palmitato na sua forma completamente estendida. Se duas moléculas de palmitato forem colocadas alinhadas e com as extremidades em contato, como o seu comprimento total poderia se comparar com a espessura da bicamada lipídica em uma membrana biológica?

6. Localização de uma proteína de membrana As seguintes observações referem-se a uma proteína de membrana desconhecida, X. Ela pode ser extraída a partir da ruptura de membranas de eritrócitos em uma solução salina concentrada e pode ser fragmentada por hidrólise com enzimas proteolíticas. O tratamento de eritrócitos com enzimas proteolíticas, seguido pela ruptura e a extração dos componen-

tes da membrana, produz a proteína X intacta. Entretanto, o tratamento de “fantasmas” de eritrócitos (que consistem em apenas membranas plasmáticas, produzidas pela ruptura de células e a remoção da hemoglobina) com enzimas proteolíticas, seguido pela ruptura e a extração, produz X extensivamente fragmentada. O que essas observações indicam sobre a localização de X na membrana? As propriedades de X se parecem com as das proteínas integrais de membrana ou com as periféricas?

7. Previsão da topologia da proteína de membrana a partir da sequência O gene para uma proteína de eritrócito humano, suspeita de ser uma proteína de membrana, foi clonado. A partir da sequência de nucleotídeos do gene, conhece-se a sequência de aminoácidos. A partir desta sequência somente, qual seria a possibilidade de que a proteína seja uma proteína integral de membrana? Suponha que seja comprovado que a proteína é uma proteína integral com um segmento transmembrana. Que experimentos bioquímicos e químicos poderiam determinar se a proteína é orientada com a extremidade aminoterminal para dentro ou para fora da célula?

8. Densidade de superfície de uma proteína de membrana. *E. coli* pode ser induzida a produzir aproximadamente 10 mil cópias do transportador de lactose (*M_r* 31.000) por célula. Suponha que *E. coli* seja um cilindro com 1 μm de diâmetro e 2 μm de comprimento. Que fração da superfície da membrana plasmática é ocupada pelas moléculas transportadoras de lactose? Explique como chegou a essa conclusão.

9. Espécies moleculares da membrana de *E. coli* A membrana plasmática da *E. coli* é composta por cerca de 75% de proteína e 25% de fosfolípido em relação ao peso. Quantas moléculas de lipídeos de membrana estão presentes para cada molécula de proteína de membrana? Considere uma *M_r* média de proteína de 50.000 e uma *M_r* média de fosfolípido de 750. O que mais é preciso para estimar a fração da superfície da membrana que é coberta por lipídeos?

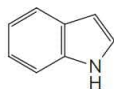
10. Dependência da temperatura na difusão lateral O experimento descrito na Figura 11-16 foi realizado a 37°C. Caso o experimento fosse realizado a 10°C, qual o efeito esperado na velocidade de difusão? Por quê?

11. Autosselamento da membrana Membranas celulares são autosselantes: se elas forem perfuradas ou rompidas mecanicamente, elas resselam rápida e automaticamente. Que propriedades da membrana são responsáveis por essa característica importante?

12. Temperatura de fusão de lipídeos Lipídeos de membrana em amostras de tecidos obtidos de diferentes partes da perna de um veado apresentam diferentes composições de ácidos graxos. Os lipídeos de membrana de tecido próximo aos cascos contêm uma proporção maior de ácidos graxos insaturados do que aqueles de tecido da parte superior da perna. Qual é o significado dessa observação?

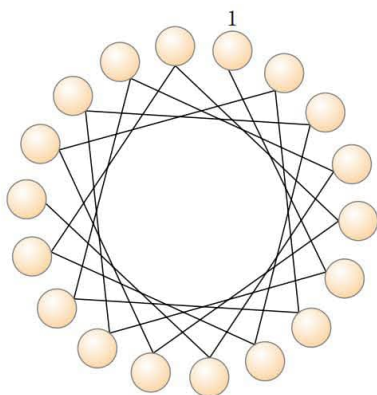
13. Difusão flip-flop A lâmina interna (monocamada) da membrana de eritrócito humano consiste predominantemente em fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina. A lâmina externa consiste predominantemente em fosfatidilcolina e esfingomielina. Embora os componentes fosfolipídicos da membrana possam difundir na bicamada fluida, essa lateralidade é sempre preservada. Como?

14. Permeabilidade da membrana Em pH 7, o triptofano atravessa a bicamada lipídica com cerca de um milésimo da taxa com que o indol, um composto estreitamente relacionado, atravessa:



Sugira uma explicação para essa observação.

15. Uso do diagrama da roda helicoidal Uma roda helicoidal é uma representação em duas dimensões de uma hélice, uma visão ao longo de seu eixo central (ver Figura 11-29b; ver também Figura 4-4d). Use o diagrama da roda helicoidal mostrado aqui para determinar a distribuição de resíduos de aminoácidos em um segmento de hélice com a sequência -Val-Asp-Arg-Val-Phe-Ser-Asn-Val-Cys-Thr-His-Leu-Lys-Thr-Leu-Gln-Asp-Lys-



O que se pode dizer sobre as propriedades da superfície dessa hélice? Que orientação da hélice se espera para a estrutura terciária da proteína integral de membrana?

16. Síntese de suco gástrico: energética O suco gástrico (pH 1,5) é produzido pelo bombeamento de HCl do plasma sanguíneo (pH 7,4) para o estômago. Calcule a quantidade de energia necessária para concentrar H^+ em 1 L de suco gástrico a 37°C. Nas condições das células, quantos moles de ATP devem ser hidrolisados para fornecer essa quantidade de energia livre? A variação na energia livre da hidrólise de ATP em condições celulares é de aproximadamente -58 kJ/mol (como explicado no Capítulo 13). Ignore os efeitos do potencial elétrico transmembrana.

17. Energética da Na^+K^+ -ATPase Dada uma célula de vertebrado típica com potencial de membrana de -0,070 V (negativo dentro), qual é a variação na energia livre para transportar 1 mol de Na^+ da célula para o sangue a 37°C? Suponha que a concentração de Na^+ dentro da célula seja 12 mM e 145 mM no plasma sanguíneo.

18. Ação da ouabaína no tecido renal A ouabaína inibe especificamente a atividade da Na^+K^+ -ATPase de tecidos animais e se sabe que ela não inibe nenhuma outra enzima. Quando a ouabaína é adicionada a fatias finas de tecido renal vivo, ela inibe o consumo de oxigênio em 66%. Por quê? O que essa observação nos diz sobre o uso de energia respiratória pelo tecido renal?

19. Energética do simporte Suponha que foi determinado experimentalmente que o sistema de transporte celular para a glicose, conduzido pelo simporte de Na^+ , pode acumular glicose até atingir concentrações 25 vezes maiores do que aquela do meio externo, quando a $[Na^+]$ externa é apenas 10 vezes maior do que a $[Na^+]$ no meio intracelular. Isso violaria as leis da termodinâmica? Se não, como essa observação pode ser explicada?

20. Marcação do transportador de lactose Um transportador bacteriano de lactose, altamente específico para a lactose, contém um resíduo de Cys que é essencial para a sua atividade de transporte. A reação covalente de *N*-etilmaleimida (NEM) com este resíduo de Cys inativa irreversivelmente o transportador. Uma alta concentração de lactose no meio impede a inativação por NEM, presumivelmente por proteger estericamente o resíduo de Cys, que se encontra no sítio de ligação da lactose ou próximo a ele. Não sabendo mais nada sobre a proteína transportadora, qual experimento poderia ser sugerido para determinar a M_r do polipeptídeo transportador contendo Cys?

21. Captação intestinal de leucina Em um estudo sobre a captação de L-leucina pelas células epiteliais do intestino de camundongo, medidas da taxa de captação de L-leucina e de vários análogos de L-leucina, na presença e na ausência de Na^+ no tampão do ensaio, produziram os resultados apresentados na tabela a seguir. O que se pode concluir sobre as propriedades e o mecanismo do transportador de leucina? Seria de esperar que a captação de L-leucina fosse inibida pela ouabaína?

Substrato	Captação na presença de Na^+		Captação na ausência de Na^+	
	V_{\max}	K_t (mM)	V_{\max}	K_t (mM)
L-Leucina	420	0,24	23	0,2
D-Leucina	310	4,7	5	4,7
L-Valina	225	0,31	19	0,31

22. Efeito de um ionóforo no transporte ativo Considere o transportador de leucina descrito no Problema 21. A V_{\max} e/ou a K_t mudaria com a adição de um ionóforo de Na^+ à solução do ensaio contendo Na^+ ? Explique.

23. Fluxo de água através de uma aquaporina Cada eritrócito humano contém cerca de 2×10^5 monômeros de AQP1. Se moléculas de água fluírem através da membrana a uma taxa de 5×10^8 por tetrâmero de AQP1 por segundo, e o volume de um eritrócito for 5×10^{-11} mL, o quão rapidamente um eritrócito poderia reduzir o volume à metade como encontrado em alta osmolaridade (1 M) no líquido intersticial da medula renal? Suponha que o eritrócito seja constituído unicamente por água.

Bioquímica online

24. Predizendo a topologia de uma proteína de membrana I Ferramentas de bioinformática disponíveis online tornam a análise de hidropatia muito fácil se a sequência da proteína for conhecida. No Protein Data Bank (www.rcsb.org), a ferramenta Protein Feature View fornece mais informações obtidas em outros bancos de dados, como o UniProt e o SCOP2. Uma simples olhada no gráfico de hidropatia criado especificando uma janela de 15 resíduos mostra regiões hidrofóbicas em vermelho e as regiões hidrofílicas em azul.

- (a) Olhando apenas os gráficos de hidropatia na ferramenta Protein Feature View, quais as predições que se pode fazer sobre a topologia na membrana em relação a: glicoforina A, mioglobina (PDB ID 1AFO) e a aquaporina (PDB ID 1MBO)?
- (b) Agora, refine a informação usando a ferramenta ProtScale no portal de recursos de bioinformática ExPASy. Cada um desses PDB do Protein Feature Views foi criado com um UniProt Knowledgebase ID (identificação da proteína). A identificação UniProtKB ID da glicoforina A é P02724, a da mioglobina é P02185 e a da aquaporina é Q6J8I9. Vá para o portal ExPASy portal (<http://web.expasy.org/protscale>) e selecione a opção de análise de hidropatia Kyte & Doolittle com uma janela de 7 aminoácidos. Entre com o UniProtKB ID da aquaporina (Q6J8I9, que também pode ser obtido na página Protein Feature View do PDB) e, então, selecione a opção para a análise completa da cadeia (resíduos 1 a 263). Use os valores *default* para as outras opções e clique em Submit para obter o gráfico de hidropatia. Salve esse gráfico como imagem GIF. Agora, repita a análise com uma janela de 15 aminoácidos. Compare os resultados das análises com a janela de 7 e a de 15 resíduos de aminoácidos. Qual das duas análises apresenta a melhor relação sinal-ruído?
- (c) Em que circunstâncias seria mais importante usar uma janela mais estreita?

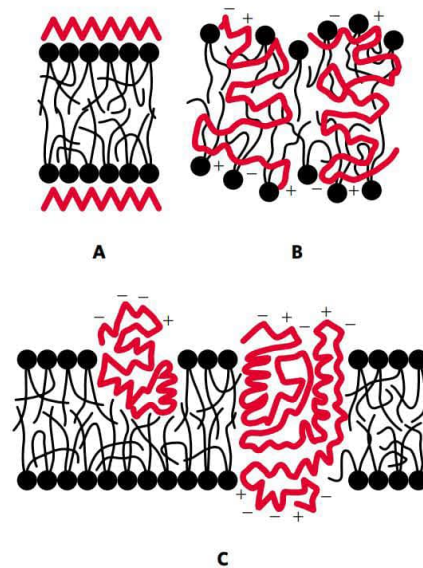
25. Predizendo a topologia de uma proteína de membrana II O receptor para o hormônio epinefrina em células animais é uma proteína integral de membrana (M_r 64.000) que se supõe ter sete regiões que atravessem a membrana.

- (a) Mostre que uma proteína desse tamanho é capaz de atravessar a membrana sete vezes.
- (b) Dada a sequência de aminoácidos da proteína, como poderia se prever quais regiões da proteína formam hélices que atravessam a membrana?
- (c) Acesse o Banco de Dados de Proteínas (www.rcsb.org). Use o identificador PDB 1DEP para buscar a página de dados para uma porção do receptor β -adrenérgico (um tipo de receptor para a adrenalina) isolado de peru. Identifique, usando a ferramenta Jmol para explorar a estrutura, se essa porção do receptor está localizada dentro da membrana ou em sua superfície. Explique a resposta. Agora, use a ferramenta Protein Feature View para ver a análise da hidrofobicidade da sequência. Como isso dá suporte para a resposta?
- (d) Busque os dados para uma porção de outro receptor, o receptor da acetilcolina em neurônios e miócitos, usando o identificador PDB 1A11. Da mesma forma que em (c), identifique onde esta porção do receptor está localizada e explique a sua resposta.

Caso ainda não tenha utilizado o PDB, ver Quadro 4-4 (p. 132) para mais informações.

Problema de análise de dados

26. O modelo do mosaico fluido da estrutura da membrana biológica A Figura 11-3 mostra o modelo de mosaico fluido da estrutura da membrana biológica, aceito atualmente. Esse modelo foi apresentado em detalhes em um artigo de revisão por S. J. Singer em 1971. No artigo, Singer apresentou os três modelos da estrutura de membrana que foram propostos naquela época:



A. Modelo de Davson-Danielli-Robertson. Esse era o modelo mais amplamente aceito em 1971, quando a revisão de Singer foi publicada. Nesse modelo, os fosfolípideos estão arranjados como uma bicamada. Proteínas são encontradas em ambas as superfícies da bicamada, ligadas a ela por interações iônicas entre grupos polares carregados dos fosfolípideos e grupos carregados das proteínas. Não há proteínas no interior da bicamada.

B. Modelo da subunidade lipoproteica de Benson. Nesse modelo, as proteínas são globulares, e a membrana é uma mistura de proteína e lipídeo. As caudas hidrofóbicas dos lipídeos estão embebidas nas partes hidrofóbicas das proteínas. Os grupos polares lipídicos estão expostos ao solvente. Não há bicamada lipídica.

C. Modelo mosaico proteína globular-lipídeo. Esse é o modelo mostrado na Figura 11-3. Os lipídeos formam uma bicamada e as proteínas estão embebidas nela, algumas se estendendo através da bicamada e outras não. As proteínas estão ancoradas na bicamada por interações hidrofóbicas entre as caudas hidrofóbicas dos lipídeos e as porções hidrofóbicas da proteína.

Considerando os dados disponíveis a seguir, considere como cada parte de informação se encaixa com cada um dos três modelos da estrutura da membrana. Qual(is) modelo(s) é(são) mantido(s), quais não são, e que restrições você tem sobre os dados ou suas interpretações? Explique o raciocínio utilizado.

- (a) Quando as células são fixadas, coradas com tetróxido de ósmio e examinadas sob microscopia eletrônica, as membranas mostram uma aparência de “trilhos de trem”, com duas linhas escuras separadas por um espaço claro.
- (b) O valor encontrado para a espessura das membranas das células fixadas e coradas da mesma forma foi de 5 a 9 nm. A espessura de uma bicamada fosfolipídica “nua”, sem proteínas, foi de 4 a 4,5 nm. A espessura de uma única monocamada de proteínas era de cerca de 1 nm.
- (c) Singer escreveu em seu artigo: “A composição média de aminoácidos das proteínas de membrana não é diferente daquela das proteínas solúveis. Em particular, uma fração substancial de resíduos é hidrofóbica” (p. 165).
- (d) Como descrito nos Problemas 1 e 2 deste capítulo, pesquisadores extraíram membranas de células, extraíram os

lipídeos e compararam a área da monocamada lipídica com a área da membrana da célula original. A interpretação dos resultados tornou-se complicada pela questão ilustrada no gráfico do Problema 1: a área da monocamada dependia da força usada para pressioná-la. Com pressões muito fracas, a razão entre a área da monocamada e a área da membrana ficava em torno de 2,0. Com pressões muito fortes – supostamente como as encontradas em células – a razão era substancialmente mais baixa.

- (e) A espectroscopia de dicroísmo circular utiliza mudanças na polarização da luz UV para fazer inferências quanto à estrutura secundária da proteína (ver Figura 4-10). Essa técnica mostrou que, em média, as proteínas de membrana têm grande quantidade de α -hélice e pouco ou nada de folha β . Esse achado foi consistente com a maioria das proteínas de membrana que possuem estrutura globular.
- (f) A fosfolipase C é uma enzima que remove os grupos polares da cabeça (inclusive o fosfato) de fosfolipídeos. Em vários estudos, o tratamento de membranas intactas com fosfolipase C removeu cerca de 70% dos grupos polares sem interromper a estrutura de “trilho de trem” da membrana.

- (g) Singer descreveu em seu artigo um estudo no qual “a glicoproteína com massa molecular aproximada de 31.000 em membranas de células sanguíneas vermelhas em seres humanos era hidrolisada em glicopeptídeos solúveis com massa molecular aproximada de 10.000, após tratamento de membranas com tripsina, enquanto as demais porções eram bastante hidrofóbicas” (p. 199). O tratamento com tripsina não causou mudanças grosseiras nas membranas, que permaneceram intactas.

A revisão de Singer também incluiu muitos outros estudos nessa área. No final, entretanto, os dados disponíveis em 1971 não provavam conclusivamente que o Modelo C estava correto. À medida que mais dados foram se acumulando, esse modelo da estrutura da membrana foi sendo aceito pela comunidade científica.

Referência

Singer, S.J. 1971. The molecular organization of biological membranes. In *Structure and Function of Biological Membranes* (L. I. Rothfield, ed.), pp. 145–222. New York: Academic Press, Inc.

Esta página foi deixada em branco intencionalmente.

Biossinalização

- 12.1 Características gerais da transdução de sinal 437
- 12.2 Receptores associados a proteínas G e segundos mensageiros 440
- 12.3 GPCR na visão, olfação e gustação 456
- 12.4 Receptores tirosinas-cinase 461
- 12.5 Receptores guanilil-ciclase, cGMP e proteína-cinase G 466
- 12.6 Proteínas adaptadoras multivalentes e balsas lipídicas da membrana 467
- 12.7 Canais iônicos controlados por portões 471
- 12.8 Regulação da transcrição por receptores nucleares de hormônios 473
- 12.9 Sinalização em microrganismos e plantas 475
- 12.10 Regulação do ciclo celular por proteínas-cinase 476
- 12.11 Oncogenes, genes supressores de tumor e morte celular programada 481

A capacidade que as células possuem de receber e responder a sinais que vêm de locais mais afastados do que a membrana plasmática é fundamental à vida. De modo constante, as células bacterianas recebem mensagens de proteínas de membrana que atuam como receptores de informação, monitorando o meio externo em relação a pH, força osmótica, disponibilidade de alimento, oxigênio, luz e presença de substâncias químicas nocivas, de predadores ou de competidores pelo alimento. Esses sinais desencadeiam respostas apropriadas, como o movimento na direção do alimento ou na direção oposta das substâncias tóxicas ou a formação de esporos em um ambiente exaurido de nutrientes. Nos organismos multicelulares, células com diferentes funções trocam vários sinais entre si. As células vegetais respondem a hormônios do crescimento e a variações na luz solar. As células animais trocam informações sobre a concentração de íons e glicose nos líquidos extracelulares, as atividades metabólicas interdependentes que ocorrem em diferentes tecidos e, no embrião, a localização correta das células durante o desenvolvimento. Em todos esses casos, o sinal representa *informação* que é detectada por receptores específicos e

convertida em resposta celular, e estas sempre envolvem processos *químicos*. Essa conversão de informação em alteração química, a **transdução de sinal**, é uma propriedade universal das células vivas.

12.1 Características gerais da transdução de sinal

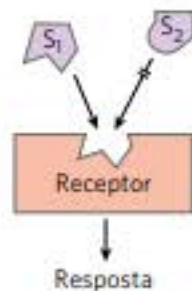
Os transdutores de sinal são impressionantemente específicos e extremamente sensíveis. A **especificidade** é alcançada por uma complementaridade molecular precisa entre as moléculas sinalizadoras e receptoras (**Figura 12-1a**), mediada pelos mesmos tipos de forças fracas (não covalentes) que regem as interações enzima-substrato e antígeno-anticorpo. Os organismos multicelulares têm um nível de especificidade adicional, visto que os receptores de um dado sinal, ou os alvos intracelulares de uma dada via de sinalização, estão presentes em apenas alguns tipos celulares. O hormônio liberador de tireotrofina, por exemplo, desencadeia respostas nas células da adeno-hipófise, mas não nos hepatócitos, que são células que não possuem receptores para esse hormônio. A adrenalina altera o metabolismo do glicogênio nos hepatócitos, mas não nos adipócitos. Nesse caso, os dois tipos de células têm receptores para esse hormônio, porém, enquanto os hepatócitos contêm glicogênio e a enzima que metaboliza o glicogênio, que é estimulada pela adrenalina, os adipócitos não têm nem um nem outro. Os adipócitos respondem à adrenalina, metabolizando triacilgliceróis para liberar ácidos graxos que, então, são transportados para outros tecidos.

São três os fatores responsáveis pela extraordinária sensibilidade da transdução de sinal: a alta afinidade dos receptores para as moléculas sinalizadoras, a cooperatividade (com frequência, mas nem sempre) da interação ligante-receptor e a amplificação do sinal por cascatas enzimáticas. A **afinidade** entre o sinal (ligante) e o receptor pode ser expressa pela constante de dissociação, K_d , geralmente 10^{-7} M ou menos. Isso significa que o receptor detecta concentrações na ordem de micromolar ou nanomolar da molécula sinalizadora.

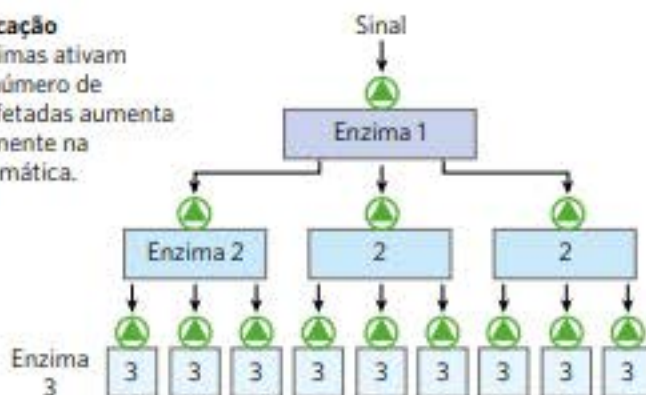
A **cooperatividade** nas interações receptor-ligante causa grandes alterações na ativação do receptor em resposta a pequenas alterações na concentração do ligante (re-

(a) Especificidade

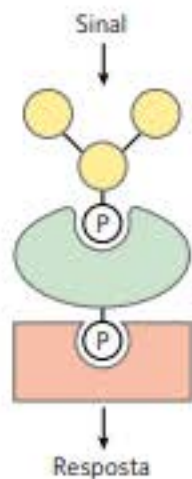
A molécula sinalizadora se encaixa no sítio de ligação do receptor complementar; outros sinais não se encaixam.

**(b) Amplificação**

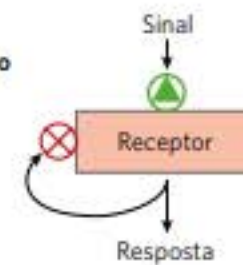
Quando enzimas ativam enzimas, o número de moléculas afetadas aumenta geometricamente na cascata enzimática.

**(c) Modularidade**

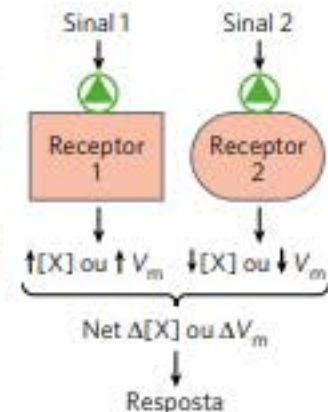
Proteínas com afinidades multivalentes formam diversos complexos de sinalização a partir de partes intercambiáveis. A fosforilação fornece pontos de interação reversíveis.

**(d) Dessensibilização/Adaptação**

A ativação do receptor dispara um circuito de retroalimentação que desliga o receptor ou o remove da superfície celular.

**(e) Integração**

Quando dois sinais apresentam efeitos opostos sobre uma característica metabólica, como, por exemplo, a concentração de um segundo mensageiro X ou o potencial de membrana V_m , a regulação é consequência da ativação integrada de ambos receptores.

**(f) Resposta localizada**

Quando a enzima que destrói uma mensagem intracelular está agrupada com o produtor da mensagem, a mensagem é degradada antes que possa se difundir a pontos distantes, de forma que a resposta é breve e fica apenas no local.

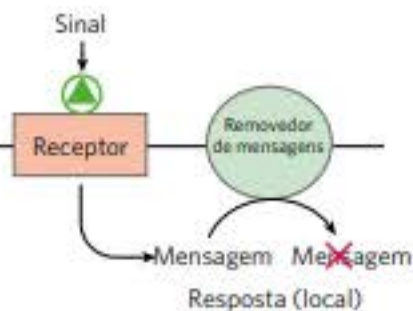


FIGURA 12-1 Seis características dos sistemas de transdução de sinal.

cordar o efeito da cooperatividade na ligação do oxigênio à hemoglobina; ver Figura 5-12). A **amplificação** ocorre quando uma enzima é ativada por um receptor de sinal e ela, por sua vez, catalisa a ativação de muitas moléculas de uma segunda enzima, que ativa muitas moléculas de uma terceira enzima, e assim por diante, nas chamadas **cascatas enzimáticas** (Figura 12-1b). Essas cascatas podem produzir amplificações de várias ordens de magnitude em milissegundos. A resposta a um sinal também deve terminar, de modo que os efeitos a jusante sejam proporcionais à intensidade do estímulo original.

As proteínas que interagem com sinais são **modulares**. Muitas proteínas sinalizadoras têm vários domínios que reconhecem características específicas em outras proteínas ou no citoesqueleto da membrana plasmática. Este sistema modular possibilita que a célula misture e pareie um conjunto de moléculas sinalizadoras para formar uma grande variedade de complexos multienzimáticos com funções diferentes e localizações celulares diferentes. Um tema comum nessas interações é a ligação entre uma proteína de sinalização modular a resíduos fosfori-

lados em outra proteína. A interação resultante pode ser regulada pela fosforilação ou desfosforilação da proteína parceira (Figura 12-1c). **Estruturas** não enzimáticas com afinidade por várias enzimas que interagem nessas cascatas mantêm essas enzimas unidas, garantindo que elas interajam em locais precisos da célula e em um tempo específico. Muitos dos domínios envolvidos em interações proteína-proteína são intrinsecamente desordenados (Figura 4-22) capazes de se enovelarem diferentemente de acordo com a proteína com a qual interagem. O resultado é que uma única proteína pode ter várias funções nas vias de sinalização.

A sensibilidade dos sistemas receptores está sujeita a modificações. Quando o sinal for mantido continuamente, o receptor fica **dessensibilizado** (Figura 12-1d) e não responde mais ao sinal. Quando o estímulo cai abaixo de certo limiar, o sistema volta a ter sensibilidade. Pense no que acontece no seu sistema de transdução visual quando você passa de um lugar com muita luz solar para um quarto escuro ou da escuridão para a luz.

Integração entre sinais (Figura 12-1e) é a capacidade que o sistema tem de receber vários sinais e produzir uma resposta unificada apropriada ao conjunto de necessidades da célula ou do organismo. Diferentes vias de sinalização se comunicam umas com as outras em diferentes níveis, gerando uma complexa “conversa cruzada” que mantém a homeostasia da célula ou do organismo.

Uma característica notável dos sistemas de transdução de sinal é a **localização da resposta** no interior da célula (Figura 12-1f). Quando os componentes de um sistema de sinalização ficam confinados em estruturas subcelulares (p. ex., uma balsa na membrana plasmática), uma célula pode regular o processo localmente sem afetar outras regiões da célula.

Uma das revelações que a pesquisa sobre sinalização proporcionou é o grau excepcional de conservação dos mecanismos de sinalização durante o correr da evolução. Embora o número de diferentes sinais biológicos seja provavelmente na ordem de milhares (a Tabela 12-1 lista alguns dos tipos mais importantes) e os tipos de respostas desencadeadas por esses sinais sejam também numerosos, a maquinaria de transdução de todos esses sinais está construída ao redor de cerca de 10 tipos de componentes proteicos.

Neste capítulo, serão examinados alguns exemplos das principais classes de mecanismos de sinalização, focando no quanto eles são integrados em funções biológicas específicas, como a resposta a hormônios e fatores de crescimento, a sensação da postura, os cheiros e sabores, a transmissão de sinais nervosos e o controle do ciclo celular. Com frequência, o resultado de uma via de sinalização é a fosforilação de algumas proteínas específicas na célula-alvo, que têm suas atividades alteradas e, assim, as atividades da célula são alteradas. Ao longo desta discussão, será dada ênfase à conservação dos mecanismos fundamentais da transdução de sinais biológicos e à adaptação desses mecanismos básicos a uma ampla gama de rotas de sinalização.

Serão abordados detalhes moleculares de vários sistemas representativos de transdução de sinal, classificados de acordo com o tipo de receptor. O gatilho de cada sistema é diferente, mas as características gerais da transdução de sinal são comuns a todos: um sinal interage com o receptor; o receptor ativado interage com a maquinaria celular, produzindo um segundo sinal ou uma alteração na atividade de

uma proteína celular, a atividade metabólica da célula-alvo sofre uma modificação e, finalmente, o evento de transdução termina. Para ilustrar as características gerais dos sistemas de sinalização, serão vistos exemplos de quatro tipos básicos de receptores (**Figura 12-2**).

1. *Receptores associados a proteínas G* que ativam *indiretamente* (por meio de proteínas de ligação ao GTP, ou proteínas G) enzimas que geram segundos mensageiros intracelulares. Esse tipo de receptor é ilustrado pelo sistema receptor β -adrenérgico, que detecta adrenalina (Seção 12.2). A visão, a olfação e a gustação são sistemas sensoriais que também agem por meio de receptores acoplados a proteínas G (Seção 12.3).
2. *Enzimas receptoras* na membrana plasmática têm a atividade enzimática no lado citoplasmático que é disparada quando o ligante se liga no lado extracelular. Os receptores com atividade de tirosina-cinase, por exemplo, catalisam a fosforilação de resíduos de Tyr em proteínas-alvo específicas. O receptor de insulina é um exemplo (Seção 12.4), e o receptor do fator de crescimento da epiderme (EGFR, do inglês, *epidermal growth factor receptor*) é outro. Os receptores guanilato-ciclase também caem nessa classe geral (Seção 12.5).
3. *Canais iônicos com portões* na membrana plasmática, que abrem e fecham (por isso o termo “portões”) em resposta à interação de ligantes químicos ou alterações no potencial transmembrana. Esses são os transdutores de sinal mais simples.
4. *Receptores nucleares* interagem com ligantes específicos (como o hormônio estrogênio) e alteram a taxa em que genes específicos são transcritos e traduzidos em proteínas celulares. Como os hormônios esteroides funcionam por meio de mecanismos intimamente relacionados à regulação da expressão gênica, eles serão considerados apenas brevemente neste capítulo (Seção 12.8), e as suas ações serão discutidas com mais detalhes no Capítulo 28.

Ao começar esta discussão sobre sinalização biológica, é preciso fazer algumas observações sobre a nomenclatura das proteínas sinalizadoras. Em geral, essas proteínas foram descobertas em determinado contexto, receberam nomes dentro deste e depois se mostraram envolvidas em uma gama mais ampla de funções biológicas para as quais o nome original não ajuda mais. Por exemplo, a proteína retinoblastoma (pRb) foi identificada inicialmente como local de uma mutação que contribui para o câncer de retina (retinoblastoma), porém, agora se sabe que ela atua em muitas vias essenciais para a divisão celular em todas as células, não somente nas da retina. A alguns genes e proteínas são dados nomes não comprometedores: a proteína supressora tumoral p53, por exemplo, é uma proteína de 53 kDa, mas esse nome não dá indícios da sua grande importância na regulação da divisão celular e no desenvolvimento do câncer. Este capítulo define, em linhas gerais, os nomes dessas proteínas à medida que elas aparecem, apresentando os no-

TABELA 12-1 Alguns sinais aos quais as células respondem

Antígenos	Luz
Glicoproteínas/oligossacarídeos da superfície celular	Toque mecânico
	Micróbios, insetos patógenos
Sinais de desenvolvimento	Neurotransmissores
Componentes da matriz extracelular	Nutrientes
Fatores de crescimento	Odores
Hormônios	Feromônios
Hipoxia	Sabores

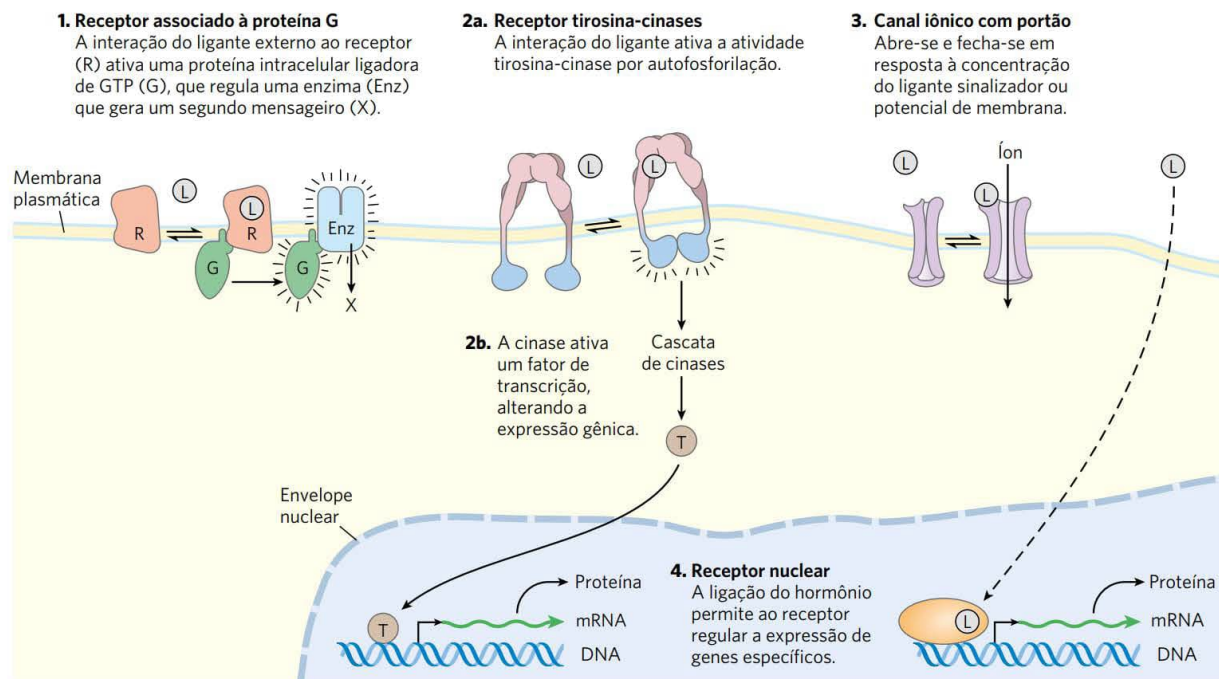


FIGURA 12-2 Quatro tipos gerais de transdutores de sinais.

mes comumente usados pelos pesquisadores da área. Não desanime se não conseguir gravá-los de primeira!

RESUMO 12.1 Características gerais da transdução de sinal

- Todas as células têm mecanismos de transdução de sinal específicos e altamente sensíveis, que se mantiveram conservados durante o correr da evolução.
- Vários estímulos atuam por meio de receptores proteicos específicos.
- Os receptores ligam a molécula sinalizadora e iniciam o processo que amplifica o sinal, integram-no com outros receptores e transmitem a informação através da célula ou, em alguns casos, para alguma região localizada da célula. Se o sinal persiste, a dessensibilização do receptor reduz ou cessa a resposta.
- Os organismos multicelulares têm quatro tipos gerais de mecanismos de sinalização: proteínas da membrana plasmática que agem por meio de proteínas G, receptores com atividade enzimática própria (como tirosina-cinase), canais iônicos com portões e receptores nucleares que ligam esteroides e modificam a expressão gênica.

12.2 Receptores associados a proteínas G e segundos mensageiros

Como o nome diz, **receptores acoplados a proteínas G (GPCRs)** são receptores que agem por meio de algum membro da família das **proteínas que ligam nucleotí-**

deos de guanosina, ou proteína G. Três componentes essenciais definem a transdução da sinalização via GPCR: um receptor na membrana plasmática com sete segmentos helicoidais transmembrana, uma proteína G que se alterna entre as formas ativa (ligada a GTP) e inativa (ligada a GDP) e uma enzima efetora (ou canal iônico) na membrana plasmática que é regulada pela proteína G ativada. Um sinal extracelular, como um hormônio, fator de crescimento ou neurotransmissor, é o “primeiro” mensageiro que ativa um receptor do lado externo da célula. Quando o receptor é ativado, a proteína G que está associada ao receptor troca o GDP que tem ligado por um GTP do citosol. A proteína G, então, dissocia-se do receptor ativado e liga-se à enzima efetora presente nas proximidades que alteram suas atividades. A enzima efetora provoca, então, uma mudança na concentração citosólica de um metabólito de baixo peso molecular ou íon inorgânico que age como **segundo mensageiro** para ativar ou inibir um ou mais alvos na sequência da via, geralmente alguma proteína-cinase.



O genoma humano codifica para pouco mais de 800 GPCRs, cerca de 350 para detectar hormônios, fatores de crescimento e outros ligantes endógenos e, talvez, 500 atuem como receptores olfatórios (cheiros) e gustatórios (sabores). Esses receptores acoplados a proteínas G estão implicados em muitas doenças humanas frequentes, incluindo alergias, depressão, cegueira, diabetes e várias deficiências cardiovasculares, com sérias consequências para a saúde. Mutações em GPCRs também são encontradas em 20% dos cânceres. Mais de um terço de *todos* os medicamentos que estão disponíveis no mercado têm como alvo uma ou outra GRRC. Por exemplo, o receptor β -adrenérgico,

que controla os efeitos da adrenalina, é o alvo dos “bloqueadores beta”, prescritos para condições tão diversas como hipertensão, arritmia cardíaca, glaucoma, ansiedade e enxaqueca. Mais de 100 das GPCR encontradas no genoma humano ainda são “receptores órfãos”, o que quer dizer que os seus ligantes naturais ainda não foram identificados e, desse modo, não se sabe nada sobre a biologia desses receptores. O receptor β -adrenérgico, cuja biologia e farmacologia são bem compreendidas, é o protótipo para todos os GPCR e, por isso, a discussão sobre os sistemas transdutores de sinal inicia-se com ele. ■

O sistema dos receptores β -adrenérgicos age por meio do segundo mensageiro cAMP

A adrenalina dispara o alarme quando alguma ameaça exige que o organismo mobilize sua maquinaria de geração de energia; ela sinaliza a necessidade de “lutar ou fugir”. A ação da adrenalina é iniciada quando o hormônio se liga ao seu receptor proteico na membrana plasmática de uma célula sensível à adrenalina. Os **receptores adrenérgicos** (“adrenérgico” refere-se à adrenalina, o outro nome da epinefrina), α_1 , α_2 , β_1 e β_2 são definidos pelas diferenças nas afinidades e nas respostas a um grupo de agonistas e antagonistas. **Agonistas** são moléculas (ligantes naturais ou análogos estruturais) que se ligam a um receptor e produzem os efeitos do ligante natural. **Antagonistas** são análogos que se ligam ao receptor sem disparar o efeito normal e, assim, bloqueiam os efeitos dos agonistas, inclusive do ligante natural. Em alguns casos, a afinidade do receptor por agonistas ou antagonistas sintéticos é maior do que pelo agonista natural (**Figura 12-3**). Quatro tipos de receptores adrenérgicos são encontrados em tecidos-alvo diferentes e controlam respostas diferentes à adrenalina. A discussão ficará focada nos **receptores β -adrenérgicos** do músculo, do fígado e do tecido adiposo. Esses receptores controlam alterações no metabolismo energético, conforme descrito no Capítulo 23, inclusive o aumento na degradação de glicogênio e gordura. Os receptores adrenérgicos dos subtipos β_1 e β_2 agem por meio do mesmo mecanismo, de modo que, nessa discussão, o termo “ β -adrenérgico” aplica-se aos dois tipos.

Como todos os GPCR, o receptor β -adrenérgico é uma proteína integral de membrana com sete regiões hidrofóbicas helicoidais com 20 a 28 resíduos de aminoácidos, que atravessam a membrana plasmática sete vezes, originando, assim, o nome alternativo para os GPCR: **receptores hepta-helicoidais**. A ligação da adrenalina ao sítio no receptor mergulhado na membrana plasmática (**Figura 12-4a**, etapa ①) promove uma alteração conformacional no domínio intracelular do receptor que afeta a sua interação com uma proteína G que está associada ao receptor, promovendo a dissociação do GDP e a ligação do GTP (etapa ②). Em todos os GPCR, a proteína G é heterotrimerica, composta por três subunidades diferentes: α , β e γ . As proteínas G, por isso, também são conhecidas como **proteínas G triméricas**. Neste caso, é a subunidade α que se liga ao GDP ou GTP e transmite o sinal do receptor ativado para a proteína efetora. Devido ao fato de que a proteína G ativa seu efeto-

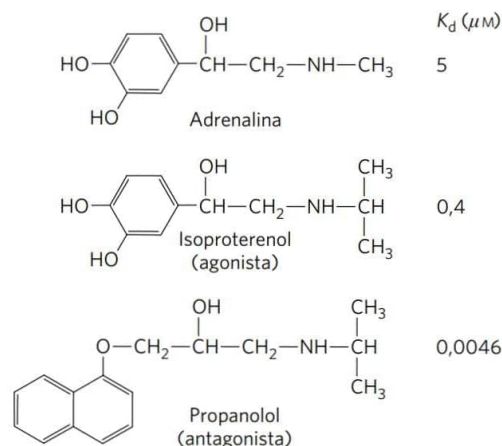


FIGURA 12-3 Adrenalina e seus análogos sintéticos. A adrenalina, também denominada epinefrina, é liberada pela glândula suprarrenal e regula o metabolismo energético no músculo, no fígado e no tecido adiposo. Ela também serve de neurotransmissor nos neurônios adrenérgicos. A sua afinidade pelo receptor é expressa como a constante de dissociação do complexo receptor-ligante. O isoproterenol e o propranolol são análogos sintéticos, o primeiro é um agonista com afinidade pelo receptor maior do que a da adrenalina e o segundo é um antagonista com afinidade extremamente alta.

ela é denominada **proteína G estimuladora** ou **G_s** . Assim como outras proteínas G (Quadro 12-1), a G_s funciona como um “comutador” biológico: quando o sítio de ligação a nucleotídeos na G_s (na subunidade α) é ocupado por GTP, a G_s é ativada e pode ativar sua proteína efetora (neste caso, a adenilil-ciclase); com GDP ligado ao sítio, a G_s é inativa. Na forma ativa, as subunidades β e γ da G_s dissociam-se da subunidade α como dímero $\beta\gamma$ e G_{sa} . Quando GTP estiver ligado, ele move-se no plano da membrana, liberando-se do receptor e ligando-se a uma molécula de adenilil-ciclase das proximidades (etapa ③). A G_{sa} é mantida na membrana por ligação covalente a um grupo palmitoila (ver Figura 11-13).

A **adenilil-ciclase** é uma proteína integral da membrana plasmática, com o sítio situado na face citoplasmática. A associação entre a G_{sa} e a adenilil-ciclase ativa a ciclase para catalisar a síntese do segundo mensageiro cAMP a partir de ATP (**Figura 12-4a**, etapa ④; **Figura 12-4b**), aumentando a concentração de cAMP no citosol. A interação entre G_{sa} e a adenilil-ciclase só é possível quando a G_{sa} está ligada à GTP. O genoma dos mamíferos codifica nove isoenzimas da adenilil-ciclase e da membrana, todas com seqüências altamente conservadas, porém, supõe-se, com funções discretas.

A estimulação por G_{sa} é autolimitante. A G_{sa} tem uma atividade **GTPase intrínseca** que inativa a G_{sa} pela conversão de GTP a GDP (**Figura 12-5**). A G_{sa} , agora inativa, dissocia-se da adenilil-ciclase, causando a inativação da ciclase. A G_{sa} associa-se novamente com o dímero $\beta\gamma$ ($G_{s\beta\gamma}$) e a G_s fica disponível para interagir com um receptor que tenha um hormônio ligado.

O papel de G_{sa} como um “comutador” proteico biológico não é exclusivo. Diversas proteínas G agem como comutadores binários em sistemas de sinalização com GPCR e em

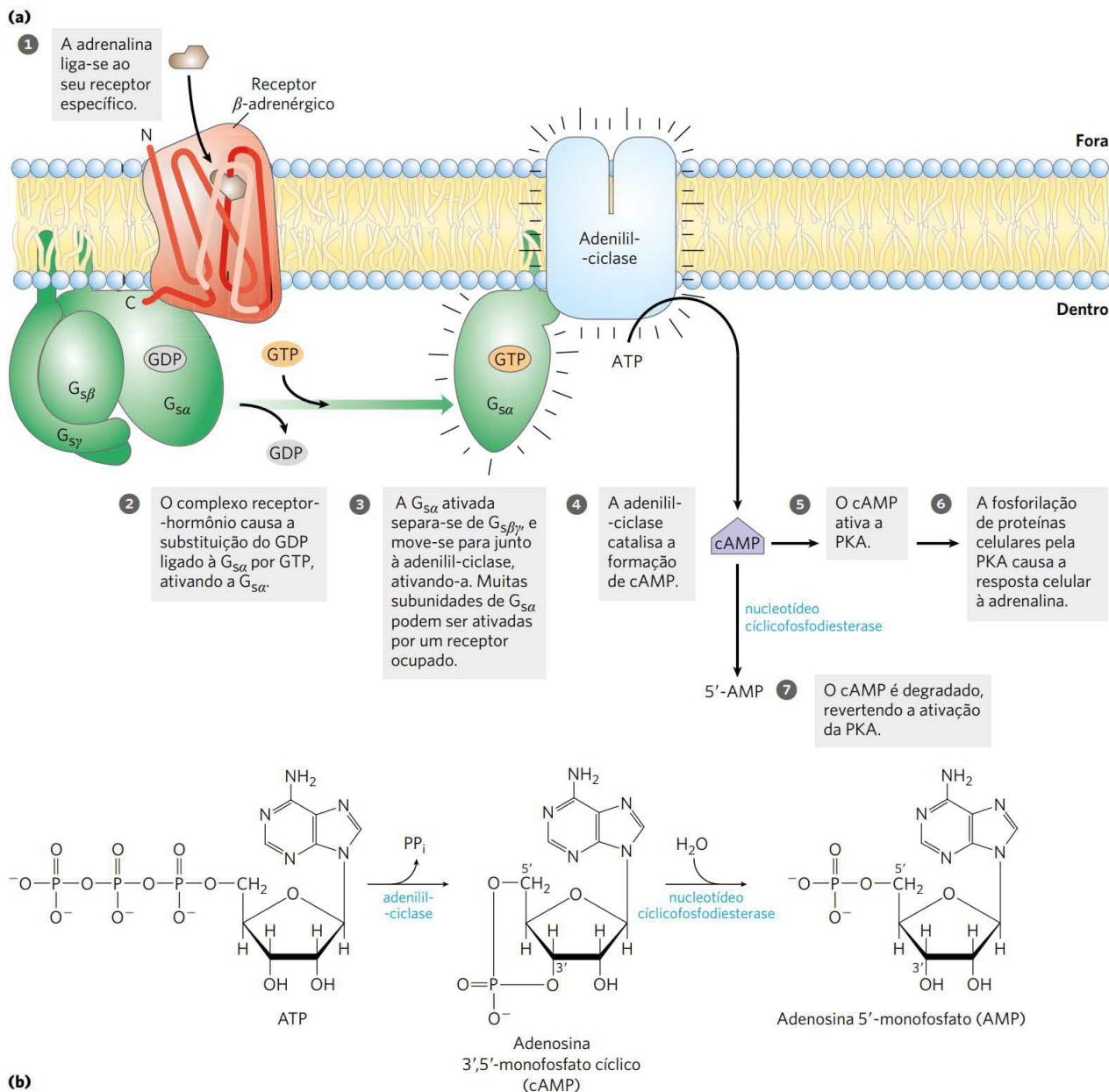


FIGURA 12-4 Transdução do sinal da epinefrina: a via β -adrenérgica. (a) Mecanismo que acopla a ligação da adrenalina ao seu receptor com ativação da γ -adenilil-ciclase. As sete etapas estão discutidas no texto. A mesma molécula de adenilil-ciclase na membrana plasmática pode ser regulada por uma proteína G estimuladora (G_s), como mostrado, ou por uma proteína G inibitória (G_i , não mostrado). G_s e G_i estão sob influência de diferentes hormônios. Os hormônios que induzem a ligação do GTP à G_s causam inibição da adenilil-ciclase, resultando em diminuição da [cAMP] celular. (b) Ação combinada das enzimas que catalisam as etapas 4 e 7, síntese e hidrólise do cAMP pela adenilil-ciclase e pela fosfodiesterase do cAMP, respectivamente.

muitos processos que envolvem fusão ou fissão de membranas (Quadro 12-1).

A adrenalina exerce seus efeitos a jusante pelo aumento na [cAMP], que resulta da ativação da adenilil-ciclase. O AMP cíclico, por sua vez, ativa alostericamente a **proteína-cinase dependente de cAMP**, também chamada de **proteína-cinase A** ou **PKA** (Figura 12-4a, etapa 5), que, por sua vez, catalisa a fosforilação de resíduos de Ser ou Thr

em proteínas-alvo, incluindo a cinase da glicogênio-fosforilase b. Essa enzima está ativa quando fosforilada e pode iniciar o processo de mobilização do glicogênio a partir do glicogênio armazenado no músculo e no fígado, na expectativa da necessidade de energia, como é sinalizado pela adrenalina.

A forma inativa da PKA contém duas subunidades catalíticas idênticas (C) e duas subunidades de regulação (R) (**Figura 12-6a**). O complexo tetramérico R_2C_2 é cataliticamente

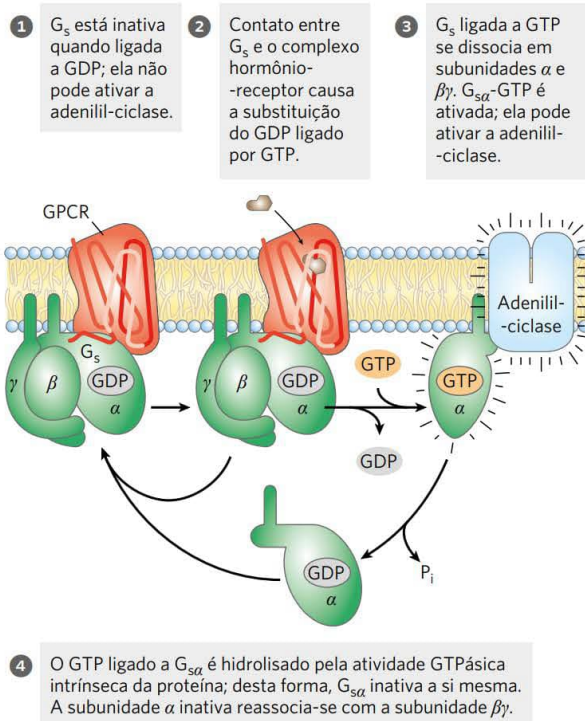


FIGURA 12-5 O comutador GTPase. As proteínas G alternam entre ligação com GDP (desligada) e com GTP (ligada). A atividade GTPásica intrínseca da proteína, em muitos casos estimulada pelas proteínas RGS (reguladores da sinalização por proteínas G; ver Quadro 12-1), determina quão rapidamente o GTP ligado é hidrolisado a GDP e, assim, por quanto tempo a proteína G permanece ativa.

inativo, pois um domínio autoinibitório em cada subunidade R ocupa a fenda de ligação ao substrato de cada subunidade C. O AMP cíclico é um ativador alostérico da PKA. Quando as subunidades R estão ligadas a cAMP, elas passam por uma alteração na conformação, que afasta o domínio autoinibitório de R do domínio catalítico de C, e o complexo R_2C_2 se dissocia, originando duas subunidades C livres e cataliticamente ativas. Esse mesmo mecanismo básico – o deslocamento de um domínio inibitório – controla a ativação alostérica pelos segundos mensageiros de muitos tipos de proteínas-quinase (p. ex., como nas Figuras 12-18 e 12-25). A estrutura da fenda de ligação ao substrato na PKA serve de protótipo para todas as proteínas-quinase conhecidas (Figura 12-6b). Certos resíduos da região desta fenda têm correspondentes idênticos em todas as 544 proteínas-quinase codificadas pelo genoma humano. O sítio de ligação a ATP de cada subunidade catalítica posiciona o ATP perfeitamente para transferir o seu grupo fosforila terminal (γ) para o —OH de uma cadeia lateral de um resíduo de Ser ou Thr na proteína-alvo.

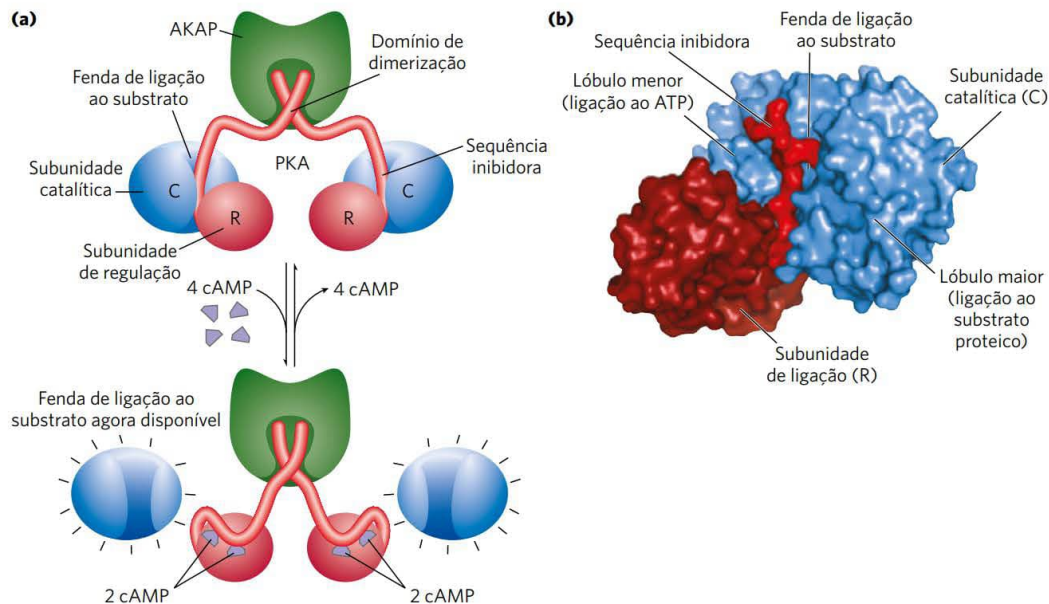


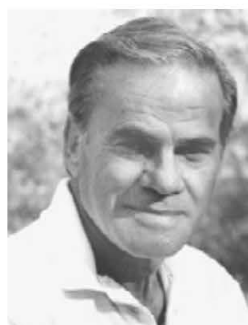
FIGURA 12-6 Ativação da proteína-quinase dependente de cAMP (PKA). (a) Quando a [cAMP] está baixa, as duas subunidades de regulação idênticas (R; em vermelho) associam-se com as duas subunidades catalíticas idênticas (C). Neste complexo R_2C_2 , as sequências inibidoras das subunidades R se inserem na fenda de ligação ao substrato das subunidades C e impedem a ligação dos substratos; o complexo está, portanto, cataliticamente inativo. As sequências aminoterminais das subunidades R interagem para a formação de um dímero R_2 , o sítio de ligação para uma proteína de ancoragem para a cinase A (AKAP), descrita posteriormente no texto. Quando a [cAMP] aumenta em resposta a um sinal hormonal, cada subunidade R se liga a duas moléculas de cAMP e sofre uma drástica reorganização que afasta a sequência inibidora da subunidade C, abrindo a fenda de ligação ao substrato e liberando cada subunidade C na forma cataliticamente ativa. (b) Estrutura cristalográfica mostrando parte do complexo R_2C_2 (uma subunidade C e parte de uma subunidade R). A região aminoterminal de subunidade R foi omitida para simplicidade. O lóbulo menor de C contém o sítio de ligação a ATP e o lóbulo maior circunda e define a fenda na qual o substrato proteico se liga e é fosforilado em um resíduo de Ser ou Thr, sendo o grupo fosfato transferido a partir do ATP. Nesta forma inativa, a sequência inibidora de R bloqueia a fenda de ligação ao substrato de C, inativando-a. [Fonte: (b) PDB ID 3FHI, C. Kim et al., *Science* 307:690, 2005.]

QUADRO 12-1 Proteínas G: comutadores binários na saúde e na doença

Alfred G. Gilman e Martin Rodbell descobriram as funções cruciais das proteínas de ligação a nucleotídeos de guanosina (proteínas G) em vários processos celulares, incluindo percepção sensorial, sinalização na divisão celular, crescimento e diferenciação, movimentos intracelulares de proteínas e vesículas membranosas e síntese proteica. O genoma humano codifica aproximadamente 200 dessas proteínas, que diferem em tamanho e estrutura de subunidades, localização intracelular e função. Todavia, todas as proteínas G compartilham uma característica comum: elas podem ser ativadas e, após um breve período, autoinativam-se, atuando como comutadores moleculares binários com temporizador integrado. Essa superfamília de proteínas inclui as proteínas G heterotrimericas, envolvidas na sinalização adrenérgica (G_s e G_i) e da visão (transducina), proteínas G pequenas, como as envolvidas na sinalização da insulina (Ras) e outras que atuam no tráfego de vesículas (ARF e Rab), no transporte para dentro e para fora do núcleo (Ran; ver Figura 27-44) e na sincronia do ciclo celular (Rho) e muitas proteínas envolvidas na síntese proteica (fator de iniciação IF2 e fatores de alongamento EF-Tu e EF-G; ver Capítulo 27). Muitas proteínas G têm lipídeos ligados covalentemente, que lhes conferem afinidade por membranas e determinam suas localizações na célula.



Alfred G. Gilman, 1941-2015
[Fonte: Shelly Katz/Liaison Agency/Getty Images.]



Martin Rodbell, 1925-1998
[Fonte: cortesia de Andrew M. Rodbell.]

Todas as proteínas G têm a mesma estrutura central e usam o mesmo mecanismo para alternarem entre uma conformação inativa, favorecida quando há GDP ligado, e uma conformação ativa, favorecida quando há GTP ligado. A proteína Ras (~ 20 kDa), unidade sinalizadora mínima, serve de protótipo para todos os membros dessa superfamília (Figura Q-1).

Na conformação ligada a GTP, a proteína G expõe regiões previamente escondidas (chamadas de **comutador I** e **comutador II**), que interagem com proteínas a jusante na rota sinalizadora, até que a proteína G se autoinative ao hidrolisar o GTP que tem ligado, que é transformado em GDP. O determinante crítico para a conformação da proteína G é o fosfato γ do GTP, que in-

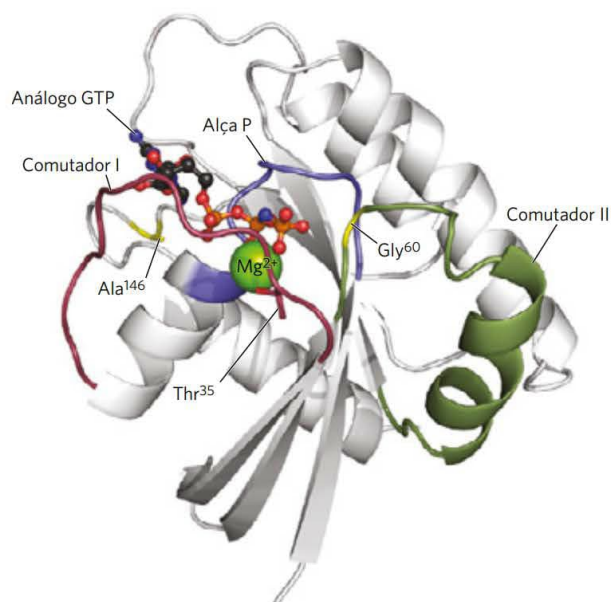


FIGURA Q-1 A proteína Ras, o protótipo para todas as proteínas G. O Mg^{2+} -GTP é mantido por resíduos de aminoácidos cruciais na alça P que liga fosfato (em azul) e pela Thr³⁵ do comutador I (em vermelho) e a Gly⁶⁰ no comutador II (em verde). A Ala¹⁴⁶ dá especificidade para GTP, e não para ATP. Na estrutura mostrada na figura, o análogo Gpp(NH)p de GTP (um análogo não hidrolisável) está ligado no sítio de ligação a GTP. [Fonte: PDB ID 5P21, E. F. Pai et al., *EMBO J.* 9:2351, 1990.]

terage com uma região denominada **alça P** (do inglês, *phosphate-binding* [ligação a fosfato]; Figura Q-2). Na proteína Ras, o fosfato γ do GTP liga-se a um resíduo de

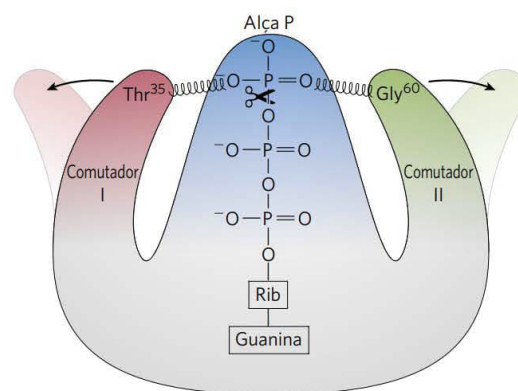


FIGURA Q-2 Quando o GTP que está ligado é hidrolisado pela atividade GTPásica da proteína Ras e da proteína ativadora da atividade GTPase (GAP), a perda das ligações de hidrogênio da Thr³⁵ e da Gly⁶⁰ determina que as regiões dos comutadores I e II relaxem para uma conformação na qual eles já não podem mais interagir com as proteínas-alvo que vêm a seguir na sequência do mecanismo de sinalização. [Fonte: informações de I. R. Vetter e A. Wittinghofer, *Scienc* 294:1299, 2001, Fig. 3.]

Lys na alça P e a dois resíduos críticos, Thr³⁵ no comutador I e Gly⁶⁰ no comutador II por ligações de hidrogênio com os oxigênios do fosfato γ do GTP. Essas ligações de hidrogênio funcionam como um par de molas que seguram a proteína na sua conformação ativa. Elas são perdidas quando o GTP é clivado a GDP e P_i é liberado, o que faz a proteína relaxar para a conformação inativa, escondendo os sítios que, no estado ativo, interagem com outras moléculas do sistema. A Ala¹⁴⁶ faz uma ligação de hidrogênio com o oxigênio da guanina, possibilitado que GTP, e não ATP, se ligue.

Atividade GTPásica intrínseca da maioria das proteínas G é muito fraca, mas ela aumenta em até 10^5 vezes por ação de **proteínas ativadoras da GTPase (GAPs, do inglês, GTPase activator protein)**, também denominadas, no caso de proteínas G heterodiméricas, **reguladores da sinalização por proteína G (RGSs, do inglês, regulators of G protein signaling; Figura 3)**. Assim, GAP e RGS determinam por quanto tempo o comutador permanece “ligado”. Elas contribuem com um resíduo de Arg essencial, que penetra no sítio ativo GTPásico da proteína G e auxilia na catálise. O processo intrinsecamente lento de substituição do GDP ligado por GTP, ativando a proteína, é catalisado por **fatores de troca de nucleotídeos de guanosina (GEF, do inglês,**

guanosine nucleotide-exchange factors) associados às proteínas G (Figura Q-3). O receptor β -adrenérgico com o ligante ligado é um dos muitos GEF. Além disso, um grande número de proteínas age como GAP. Os efeitos combinados dessas moléculas determinam o nível de proteína G com GTP ligado e, assim, reforçam a resposta aos sinais que vêm dos receptores.



Como as proteínas G desempenham funções cruciais em muitos processos de sinalização, não é de surpreender que defeitos nessas proteínas levem a diversas doenças. Em cerca de 25% de todos os cânceres humanos (proporção muito maior em certos tipos de câncer) há uma mutação na proteína Ras (geralmente em um dos resíduos cruciais próximos ao sítio de ligação a GTP ou na alça P) que praticamente anula a atividade GTPásica. Uma vez ativadas pela ligação com GTP, essas proteínas Ras permanecem constitutivamente ativas, promovendo a divisão celular em células que não deveriam estar se dividindo. O gene supressor tumoral *NF1* codifica para uma GAP que intensifica a atividade GTPásica da Ras normal. As mutações em *NF1* que resultam em uma GAP não funcional deixam Ras apenas com a atividade GTPásica intrínseca; uma vez que seja ativada pela ligação com GTP, a Ras permanece ativa, continuando a enviar o sinal: dividam-se.

Proteínas G heterotriméricas defeituosas também podem levar a doenças. Mutações em genes que codificam para a subunidade α da G_s (que media mudanças na [AMP] em resposta a estímulos hormonais) têm como resultado uma G_a que é permanentemente ativa ou inativa. As mutações “ativadoras” em geral ocorrem nos resíduos cruciais para a atividade GTPásica. Elas levam a uma [cAMP] continuamente elevada, com consequências nas etapas seguintes da via de sinalização, incluindo a proliferação celular indesejada. Por exemplo, essas mutações são encontradas em cerca de 40% dos tumores da hipófise (adenomas). Indivíduos com mutações “inativadoras” em G_a não respondem aos hormônios que atuam via cAMP (como o hormônio da tireoide). Mutações no gene que codifica para a subunidade α da transducina (T_a), que está envolvida na sinalização da visão, causam um tipo de cegueira noturna, aparentemente devido à interação defeituosa entre a subunidade T_a e a fosfodiesterase do segmento externo dos bastonetes (ver Figura 12-14). Uma variação na sequência do gene que codifica para a subunidade β de uma proteína G heterotrimérica é muito comum em indivíduos com hipertensão (pressão sanguínea elevada) e suspeita-se que essa variante gênica esteja envolvida em obesidade e aterosclerose.

As bactérias patogênicas que causam a cólera produzem uma toxina que tem como alvo a proteína G, interferindo na sinalização normal das células. A **toxina da cólera**, secretada pelo *Vibrio cholerae* no intestino da pessoa infectada, é uma proteína heterodimérica. A su-

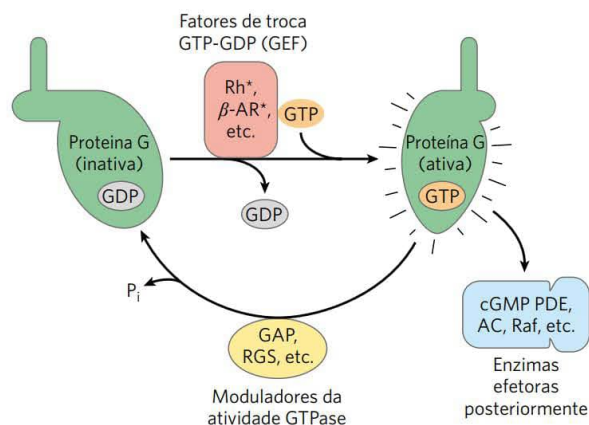


FIGURA Q-3 São muitos os fatores que regulam a atividade das proteínas G (em verde). Proteínas G inativas, tanto as proteínas G pequenas, como as proteínas Ras e as proteínas G heterodiméricas, quanto as proteínas G_s , interagem com trocadores GTP-GDP que estão a montante nas vias de sinalização (em vermelho). Em geral, esses fatores trocadores são receptores ativados (*), como a rodopsina (Rh) e os receptores β -adrenérgicos (AR). As proteínas G são ativadas pela ligação com GTP, e, na forma com GTP ligado, elas ativam enzimas efetoras situadas a jusante na via de sinalização, como cGMP-fosfodiesterase (PDE), adenilil-ciclase (AC) e Raf. As proteínas ativadoras de GTPase (GAP, no caso das proteínas G pequenas) e os reguladores da sinalização por proteínas G (RGS) (em amarelo), ao modularem a atividade GTPásica das proteínas G, determinam por quanto tempo elas permanecem ativas.

(Continua)

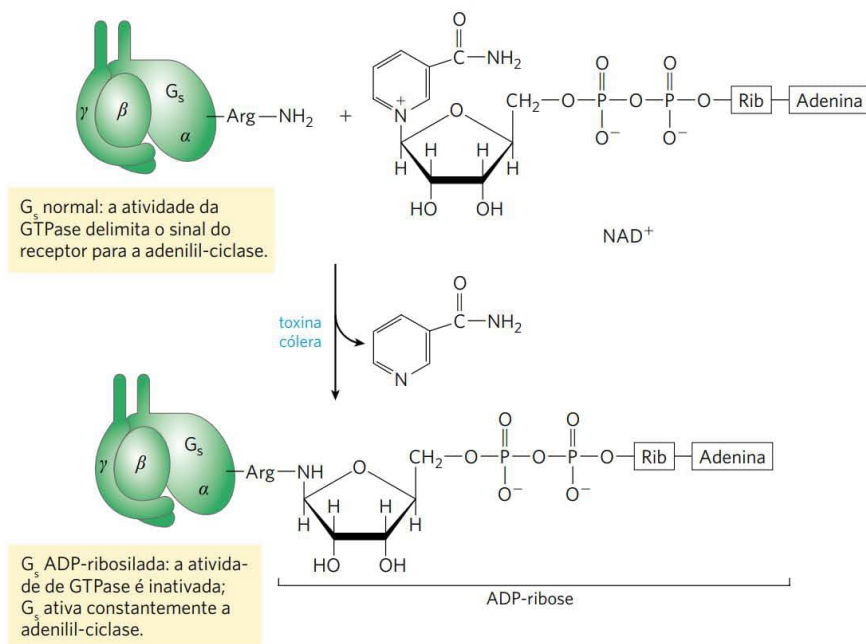
QUADRO 12-1 Proteínas G: comutadores binários na saúde e na doença (*Continuação*)

FIGURA Q-4 A toxina bacteriana que causa o cólera é uma enzima que catalisa a transferência da porção ADP-ribose da molécula de NAD^+ para um resíduo de Arg em G_s . As proteínas G assim modificadas não respondem aos estímulos hormonais normais. A patologia do cólera é o resultado de uma regulação defeituosa de adenilil-ciclase e de superprodução de cAMP.

bunidade B reconhece e liga-se a gangliosídeos específicos na superfície das células do epitélio intestinal, fornecendo uma via para a entrada da subunidade A nessas células. Depois de entrar, a subunidade A é quebrada em dois fragmentos, A1 e A2. A1 associa-se com o fator ADP-ribosilação ARF6, uma proteína G pequena, por meio de resíduos nas regiões dos comutadores I e II, que são acessíveis apenas quando ARF6 está na forma ativa (com GTP ligado). Essa associação com ARF6 ativa A1, que catalisa a transferência da ADP-ribose de uma molécula de NAD^+ para o resíduo de Arg na alça P da subunidade α da proteína G_s (Figura Q-4). A ADP-ribosilação

bloqueia a atividade GTPásica da G_s , o que faz a G_s ficar permanentemente ativa. Isso resulta em ativação contínua da adenilil-ciclase das células do epitélio intestinal, [cAMP] cronicamente elevada e PKA cronicamente ativa. A PKA fosforila o canal de Cl^- CFTR (ver Quadro 11-2) e o trocador Na^+-H^+ das células do epitélio intestinal. O resultante efluxo de NaCl provoca uma perda massiva de água pelo intestino, à medida que as células respondem, tentando restabelecer o equilíbrio osmótico. A grave desidratação e a perda de eletrólitos são as principais patologias do cólera. Isso pode ser fatal sem a intervenção rápida de uma terapia de reidratação. ■

A PKA regula muitas enzimas situadas a jusante na via de sinalização (Figura 12-4a, etapa 6). Embora esses alvos a jusante tenham diferentes funções, eles compartilham uma região com similaridade de sequência nas proximidades do resíduo de Ser ou Thr que é fosforilado, sequência que os marca para a regulação por PKA (Tabela 12-2). A fenda de ligação ao substrato da PKA reconhece essas sequências, e a enzima fosforila o resíduo de Ser ou Thr. A comparação entre sequências de várias proteínas que são substratos para a PKA levou à identificação de **sequências-consenso** – os resíduos vizinhos necessários para marcar o resíduo de Ser ou de Thr para ser fosforilado.

Do mesmo modo que em muitas vias de sinalização, a transdução de sinal pela adenilil-ciclase envolve várias etapas que *amplificam* o sinal hormonal original (**Figura**

12-7). Primeiro, a ligação de uma molécula de hormônio a uma molécula de receptor ativa cataliticamente muitas moléculas G_s , que se associam com o receptor ativado uma após a outra. Depois, pela ativação de uma molécula de adenilil-ciclase, cada molécula de G_{sa} estimula a síntese catalítica de muitas moléculas de cAMP. O segundo mensageiro cAMP, então, ativa a PKA, e cada molécula da enzima catalisa a fosforilação de *muitas* moléculas da proteína-alvo – a cinase da fosforilase *b* na Figura 12-7. Essa cinase ativa a glicogênio-fosforilase *b*, o que leva à rápida mobilização de glicose a partir de glicogênio. O efeito líquido da cascata é a amplificação do sinal hormonal em várias ordens de magnitude, o que justifica que concentrações muito baixas de adrenalina (ou de qualquer outro hormônio) já são suficientes para uma resposta hormonal. Essa via de sinalização

TABELA 12-2 Algumas enzimas e outras proteínas reguladas por fosforilação dependente de cAMP (por PKA)

Enzima/proteína	Sequência fosforilada ^a	Via/processo regulado
Glicogênio-sintase	RASCTSSS	Síntese de glicogênio
Fosforilase- <i>b</i> -cinase subunidade α subunidade β	VEFRRLSI } RTKRSGSV }	Degradação de glicogênio
Piruvato-cinase (de fígado de rato)	GVLRRASVAZL	Glicólise
Complexo piruvato-desidrogenase (tipo L)	GYLRRASV	Piruvato a acetil-CoA
Lipase sensível a hormônio	PMRRSV	Mobilização de triacilgliceróis e oxidação de ácidos graxos
Fosfofrutocinase-2/frutose-2,6-bisfosfatase	LQRRRGSSIPQ	Glicólise/gliconeogênese
Tirosina-hidroxilase	FIGRRQSL	Síntese de L-dopa, dopamina, noradrenalina e adrenalina
Histona H1	AKRKASGPPVS	Condensação do DNA
Histona H2B	KKAKASRKESYSVYVYK	Condensação do DNA
Fosfolambano cardíaco (regulador da bomba cardíaca)	AIRRAST	[Ca ²⁺] intracelular
Inibidor 1 da proteína-fosfatase 1	IRRRRPTP	Desfosforilação de proteínas
Sequência-consenso da PKA ^b	xR[RK]x[ST]B	Muitas

^aO resíduo de S ou T fosforilado está mostrado em vermelho. Todos os resíduos estão mostrados na abreviação de uma letra (ver Tabela 3-1).

^bx é qualquer aminoácido; B é qualquer aminoácido hidrofóbico. Ver, no Quadro 3-2, as convenções na descrição de sequências-consenso.

também é rápida. O sinal leva a mudanças intracelulares em milissegundos ou mesmo microssegundos.

Vários mecanismos provocam a terminação da resposta β -adrenérgica

Para ser funcional, um sistema de transdução de sinal deve ser *desligado* após o término do estímulo pelo hormônio ou por outra molécula, e mecanismos para a desativação do sinal fazem parte de todos os sistemas de sinalização. Muitos sistemas também se adaptam à presença contínua do sinal, ficando insensíveis a eles por *dessensibilização*. O sistema β -adrenérgico é ilustrativo dos dois casos. Agora o foco da discussão passa a ser a terminação.

A resposta ao estímulo β -adrenérgico termina quando a concentração da adrenalina no sangue cai abaixo da K_d do receptor. O hormônio, então, se dissocia do receptor, e este retoma a conformação inativa, na qual já não pode mais ativar G_s .

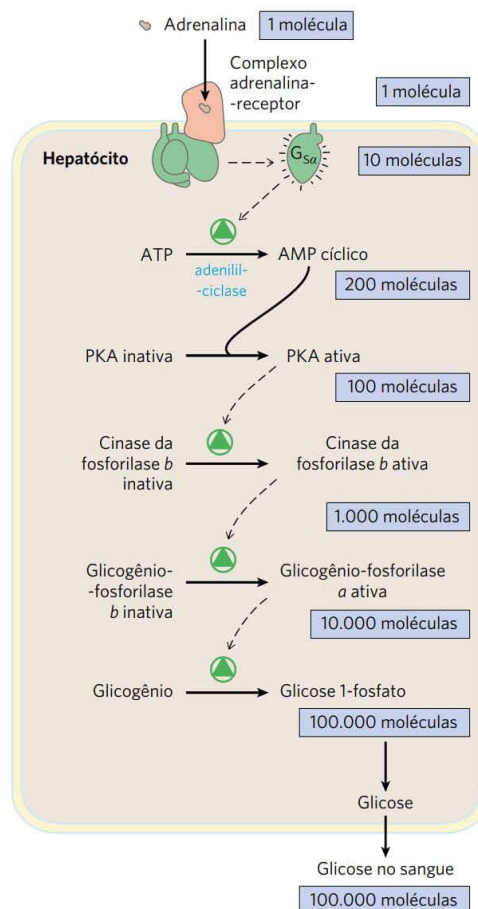


FIGURA 12-7 A cascata da adrenalina. A adrenalina desencadeia uma série de reações nos hepatócitos, onde catalisadores ativam catalisadores, resultando em uma grande amplificação do sinal hormonal original. Os números de moléculas mostrados simplesmente ilustram a amplificação e são, quase certamente, meras estimativas. A ligação de uma molécula de adrenalina a um receptor β -adrenérgico ativa diversas (possivelmente centenas) de proteínas G, uma após a outra, e cada qual ativa uma molécula da enzima adenilil-ciclase. A adenilil-ciclase atua cataliticamente e, assim, muitas moléculas de cAMP são produzidas por cada adenilil-ciclase ativada. (Como são necessárias duas moléculas de cAMP para ativar uma subunidade catalítica de PKA, esta etapa não amplifica o sinal.)

A segunda maneira de terminar a resposta é pela hidrólise do GTP ligado à subunidade G_α , catalisada pela atividade intrínseca da proteína G. A conversão do GTP ligado em GDP favorece o retorno de G_α à conformação na qual ela se liga às subunidades $G_{\beta\gamma}$, que é a conformação na qual a proteína G é incapaz de interagir com a adenilil-ciclase e estimulá-la. Com isso, deixa de haver produção de cAMP. A velocidade de inativação de G_s depende da atividade GTPásica, que é bastante fraca na subunidade G_α isolada. Entretanto, as proteínas ativadoras de GTPase (GAP) ativam fortemente essa atividade GTPásica, levando à inativação mais rápida da proteína G (ver Quadro 12-1). As próprias GAP podem ser reguladas por outros fatores, aumentando a precisão da resposta ao estímulo β -adrenérgico. Um terceiro mecanismo para terminar a resposta é a remoção do segundo mensageiro. O cAMP é hidrolisado a 5'-AMP (sem atividade de segundo mensageiro) pela **fosfodiesterase de nucleotídeo cíclico** (Figura 12-4a, etapa 7; 12-4b).

Por último, ao final da rota de sinalização, os efeitos metabólicos que resultaram da fosforilação enzimática são revertidos pela ação de fosfoproteínas-fosfatase, que hidrolisam resíduos de Ser, Thr ou Tyr fosforilados, liberando fosfato inorgânico (P_i). Cerca de 150 genes do genoma

humano codificam fosfoproteínas-fosfatase, menos do que o número (544) que codifica para proteínas-quinase, refletindo a promiscuidade das fosfoproteínas-fosfatase. Uma única fosfoproteína-fosfatase (a PP1) tem como alvo e desfosforila cerca de 200 fosfoproteínas diferentes. Sabe-se que algumas fosfatases são reguladas, ao passo que outras agem constitutivamente. Quando a [cAMP] diminui e a PKA retorna à forma inativa (etapa 7 na Figura 12-4a), o equilíbrio entre fosforilação e desfosforilação é deslocado na direção da desfosforilação por essas fosfatases.

O receptor β -adrenérgico é dessensibilizado pela fosforilação e pela associação com arrestina

Os mecanismos para o término da sinalização descritos anteriormente se iniciam com o término do estímulo. Um mecanismo diferente, a dessensibilização, suprime a resposta *mesmo enquanto o sinal persiste*. A dessensibilização do receptor β -adrenérgico é mediada por uma proteína-quinase que fosforila o receptor no domínio intracelular, que normalmente interage com G_s (Figura 12-8). Quando o receptor está com adrenalina ligada, o **receptor β -adrenérgico-quinase**, ou **β ARK** (do inglês, *beta-adrenergic receptor kinase*) (também denominada **GRK2**; ver a seguir), fosfo-

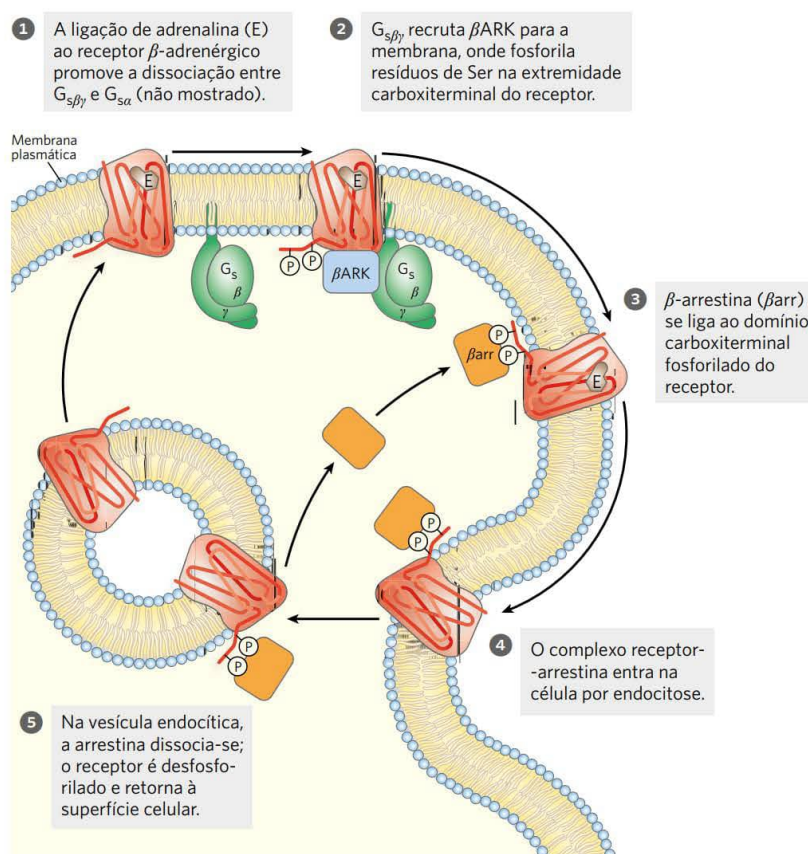


FIGURA 12-8 Dessensibilização do receptor β -adrenérgico na presença constante de adrenalina. Esse processo é mediado por duas proteínas, a proteína-quinase β -adrenérgica (β ARK) e a β -arrestina (β arr; também denominada arrestina 2). A fosforilação e a ativação da β ARK pela PKA não estão mostradas na figura. A PKA é ativada pelo aumento na [cAMP] em resposta ao sinal inicial, a adrenalina.

ri-la vários resíduos de Ser nas proximidades carboxiterminais do receptor, região que está no lado citoplasmático da membrana plasmática. A PKA, ativada devido ao aumento na [cAMP], fosforila e, assim, ativa a β ARK. A β ARK é, então, puxada para a membrana plasmática por associar-se com as subunidades G_{sp} e é assim posicionada para fosforilar o receptor. A fosforilação do receptor cria um sítio de ligação para a proteína β -arrestina, ou β arr (também denominada arrestina 2) e a ligação com a β -arrestina bloqueia os sítios do receptor que interagem com a proteína G (**Figura 12-9**). A ligação com a β -arrestina também facilita que as moléculas de receptor sejam sequestradas e removidas da membrana plasmática por endocitose na forma de pequenas vesículas intracelulares (endossomos). O complexo arrestina-receptor recruta clatrina e outras proteínas envolvidas na formação de vesículas (ver Figura 27-27), que iniciam a invaginação da membrana, o que leva à formação de endossomos contendo o receptor adrenérgico. Nesse estado, os receptores não são acessíveis à adrenalina e são, portanto, inativos. Essas moléculas de receptor são posteriormente desfosforiladas e retornam à membrana plasmática, completando o circuito e ressensibilizando o sistema para a adrenalina. A cinase do receptor β -adrenérgico pertence a uma família de **cinases de receptores associados a proteínas G (GRK)**, do inglês, *G protein-coupled receptor kinases*, sendo que todas fosforilam GPCR nos domínios citoplasmáticos carboxiterminais e têm papel semelhante ao da β ARK na dessensibilização e ressensibilização dos receptores. Pelo menos cinco GRK diferentes e quatro arrestinas diferentes estão codificadas no genoma humano, cada GRK é capaz de dessensibilizar um subconjunto específico de GPCRs e cada

arrestina pode interagir com muitos tipos diferentes de receptores fosforilados.



O complexo receptor-arrestina tem outro papel importante. Ele inicia a sinalização por uma via diferente de sinalização, a cascata da MAPK, descrita a seguir. Desse modo, a adrenalina dispara duas vias de sinalização agindo por meio de uma única GPCR. As duas vias, uma disparada pela interação do receptor com a proteína G e a outra pela interação com a arrestina, podem ser afetadas de maneiras diferentes por agonistas. Em alguns casos, um agonista favorece a via da proteína G e, em outros, a via da arrestina. A importância disso deve ser levada em consideração quando se desenvolve medicamentos que agem por meio de uma GPCR. Por exemplo, as drogas do grupo dos opiáceos que mais viciam agem mais intensamente por meio da sinalização por proteínas F do que por meio da arrestina. Um opiáceo ideal para o tratamento da dor deve agir por meio do ramo da via que produz efeitos terapêuticos, e não da via que vicia. ■

O AMP cíclico age como segundo mensageiro para muitas moléculas reguladoras

A adrenalina é somente um dos muitos hormônios, fatores de crescimento e outras moléculas reguladoras que atuam por alteração na [cAMP] intracelular e, desta maneira, regulam a atividade da PKA (Tabela 12-3). Por exemplo, o glucagon liga-se ao seu receptor na membrana plasmática dos adipócitos, ativando (via uma proteína G_s) a adenilil-ciclase. A PKA, estimulada pelo consequente aumento na [cAMP], fosforila e ativa duas proteínas essenciais para a mobilização dos ácidos graxos dos depósitos de gordura (ver Figura 17-3). De maneira semelhante, o hormônio peptídico ACTH

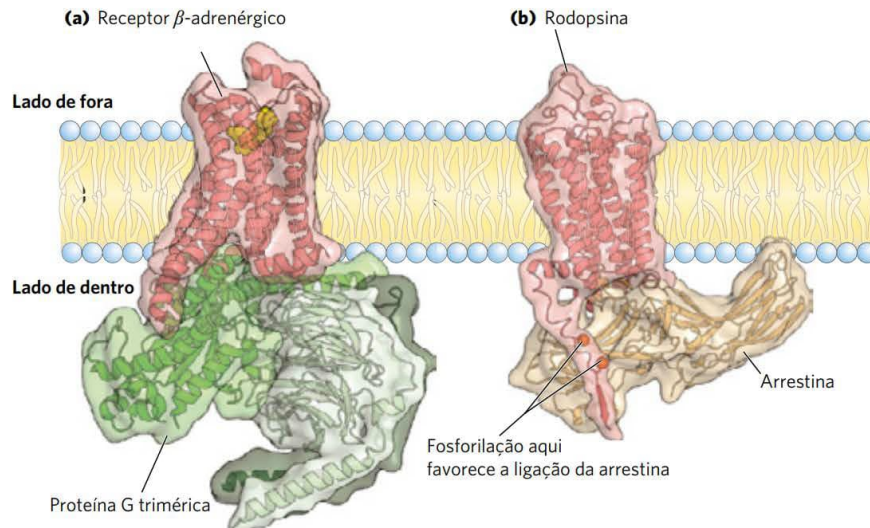


FIGURA 12-9 A proteína G trimerica e a arrestina se excluem mutuamente na interação com a GPCR. (a) Complexo do receptor β -adrenérgico com a proteína G trimerica, G_s . (b) O complexo da β -arrestina com o receptor β -adrenérgico ainda não foi solucionado, mas o complexo com uma proteína muito semelhante, GPCR, a rodopsina da visão, foi solucionado e está mostrado na figura. (A discussão sobre a rodopsina está mais adiante neste capítulo.) A comparação das duas estruturas deixa claro que a ligação da arrestina bloqueia a ligação da proteína G, o que impede a posterior ativação de proteínas G, terminando a resposta ao sinal inicial (adrenalina). [Fontes: (a) PDB ID 3SN6, S. G. F. Rasmussen et al., *Nature* 477:549, 2011, Fig. 2c. (b) PDB ID 4ZWJ, Y. Kang et al., *Nature* 523:561, 2015, Fig. 2b.]

TABELA 12-3 Alguns sinais que utilizam cAMP como segundo mensageiro

Corticotrofina (ACTH)
Hormônio liberador de corticotrofina (CRH)
Dopamina [D ₁ , D ₂]
Adrenalina (β -adrenérgica)
Hormônio folículo-estimulante (FSH)
Glucagon
Histamina [H ₂]
Hormônio luteinizante (LH)
Hormônio estimulador de melanócitos (MSH)
Odorantes (muitos)
Hormônio da paratireoide
Prostaglandinas E ₁ , E ₂ (PGE ₁ , PGE ₂)
Serotonina [5-HT ₁ , 5-HT ₄]
Somatostatina
Moléculas de sabor (doce, amargo)
Hormônio estimulador da tireoide

Nota: subtipos dos receptores entre colchetes. Os subtipos podem ter diferentes mecanismos de transdução. Por exemplo, a serotonina é detectada em alguns tecidos por receptores dos subtipos 5-HT₁ e 5-HT₄, que agem via adenilil-ciclase e cAMP, e em outros tecidos por receptores dos subtipos 5-HT₂, que agem por um mecanismo que envolve a fosfolipase C-IP₃ (ver Tabela 12-4).

(do inglês, *adrenocorticotrophic hormone* [hormônio adrenocorticotrófico]; também chamado de corticotrofina), produzido pela adeno-hipófise, liga-se a receptores específicos no córtex da glândula suprarrenal, ativando a adenilil-ciclase e elevando a [cAMP] intracelular. A PKA, então, fosforila e ativa diversas enzimas necessárias para a síntese de cortisol e outros hormônios esteroides. Em muitos tipos de células, a subunidade catalítica da PKA também pode se transportar para dentro do núcleo, onde fosforila a **proteína de ligação do elemento de resposta a cAMP** (CREB, do inglês, *cAMP response element binding protein*), que altera a expressão de genes específicos regulados por cAMP.

Alguns hormônios agem por meio da *inibição* da adenilil-ciclase, *reduzindo*, dessa maneira, a [cAMP] e *suprimindo* a fosforilação de proteínas. Por exemplo, a ligação da somatostatina ao seu receptor no pâncreas leva à ativação de uma **proteína G inibitória**, ou G_i, estruturalmente homóloga à G_s, mas que inibe a adenilil-ciclase e diminui a [cAMP]. Dessa maneira, a somatostatina inibe a secreção de vários hormônios, incluindo o glucagon. No tecido adiposo, a prostaglandina E₂ (PGE₂; ver Figura 10-17) inibe a adenilil-ciclase, reduzindo a [cAMP] e retardando a mobilização das reservas lipídicas iniciada por adrenalina e glucagon. Em outros tecidos, a PGE₂ estimula a síntese de cAMP. Os seus receptores estão acoplados à adenilil-ciclase por uma proteína G estimuladora, G_s. Nos tecidos com receptores α_2 -adrenérgicos, a adrena-

lina diminui a [cAMP]. Nesse caso, os receptores estão acoplados à adenilil-ciclase por meio de uma proteína G inibitória, G_i. Em resumo, um sinal extracelular, como a adrenalina ou a PGE₂, pode ter efeitos completamente diferentes em diferentes tecidos ou tipos celulares, dependendo de três fatores: o tipo de receptor no tecido, o tipo de proteína G (G_s ou G_i) ao qual o receptor está acoplado e o conjunto de enzimas-alvo da PKA nas células. Fazendo a somatória das influências que levam a aumentar ou diminuir a [cAMP], a célula consegue integrar os sinais, uma característica geral dos mecanismos de transdução de sinal (Figura 12-1e).

Outro fator que explica de que modo tantos sinais diferentes podem ser mediados por um único segundo mensageiro (cAMP) é a restrição dos processos de sinalização a regiões específicas da célula por meio das **proteínas adaptadoras** – proteínas não catalisadoras que agrupam outras moléculas de proteínas que agem em conjunto (descritas em mais detalhes a seguir). **Proteínas de ancoragem da cinase A** (AKAP, do inglês, *A kinase anchoring proteins*) possuem vários domínios diferentes que ligam proteínas. Elas são adaptadoras de proteínas multivalentes. Um domínio liga as subunidades R da PKA (ver Figura 12-6a) e outro liga uma estrutura específica da célula, confinando a PKA nas vizinhanças dessa estrutura. Por exemplo, AKAP específicas ligam PKA a microtúbulos, filamentos de actina, canais iônicos, mitocôndrias ou núcleo. Diferentes tipos celulares têm diferentes complementos de AKAP, de modo que cAMP pode estimular a fosforilação de proteínas mitocondriais em uma célula e a fosforilação de filamentos de actina em outra. Em alguns casos, uma AKAP conecta a PKA à enzima que leva à ativação da PKA (adenilil-ciclase) ou que extingue a ação da PKA (cAMP-fosfodiesterase ou fosfoproteína-fosfatase) (**Figura 12-10**). Supõe-se que a grande aproximação entre enzimas de ativação e inativação desencadeia uma resposta muito breve e extremamente localizada.

Agora, ficou esclarecido que, para entender completamente a sinalização celular, os pesquisadores precisam de ferramentas que sejam precisas o suficiente para detectar e estudar onde o processo de sinalização ocorre no nível subcelular e quando ele ocorre em tempo real. Para os estudos de localização intracelular das variações bioquímicas, a bioquímica encontra-se com a biologia celular, e as técnicas que cruzam esta fronteira mostraram-se essenciais para a compreensão das rotas de sinalização. As sondas fluorescentes têm ampla aplicação nos estudos sobre sinalização. A marcação de proteínas funcionais com marcadores fluorescentes, como a proteína de fluorescência verde, revela a sua localização dentro da célula (GPF) (ver Figura 9-16). As variações no estado de associação de duas proteínas (como as subunidades R e C da PKA) podem ser estimadas pela medida da transferência não radioativa de energia entre sondas fluorescentes ligadas a cada proteína, técnica chamada de transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET, do inglês, *fluorescence resonance energy transfer*; Quadro 12-2).

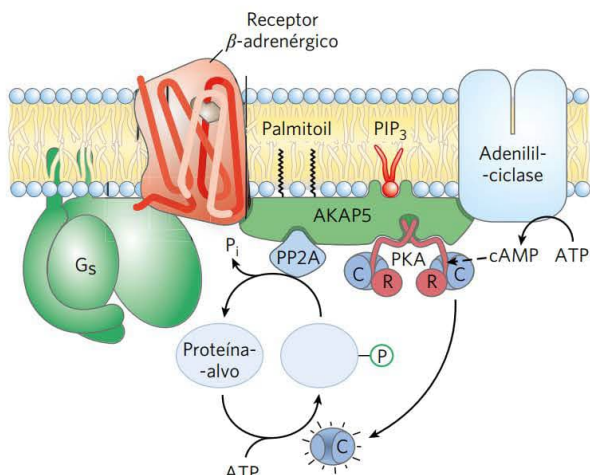
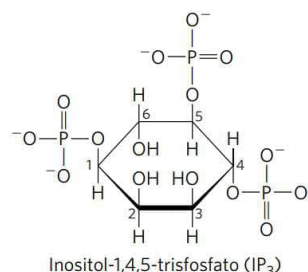


FIGURA 12-10 A nucleação de complexos supramoleculares pelas proteínas de ancoragem da cinase A (AKAP). A AKAP5 é uma família de proteínas que agem como andaimes, fixando as subunidades catalíticas da PKA, por meio de interações da AKAP5 com as subunidades regulatórias da PKA, nas proximidades de uma determinada região ou estrutura da célula. A AKAP5 é dirigida para as balsas da face citoplasmática da membrana plasmática e ligada à membrana por dois grupos palmitoila e um sítio que liga fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato (PIP₃) à membrana. A AKAP5 também tem sítios de ligação para o receptor β -adrenérgico, a adenilil-ciclase, a PKA e uma fosfoproteína-fosfatase (PP2A), aproximando todas essas proteínas no plano da membrana. Quando a adrenalina se liga ao receptor β -adrenérgico, a adenilil-ciclase produz cAMP, que chega à PKA das vizinhanças rapidamente e muito pouco diluído. A PKA fosforila a sua proteína-alvo, alterando a atividade, que permanece alterada até que a fosfoproteína-fosfatase remova o grupo fosfato e retorne a proteína-alvo ao seu estado pré-estímulo. As AKAP neste e em outros casos originam uma alta concentração local de enzimas e segundos mensageiros, de modo que o circuito de sinalização permanece extremamente localizado e a duração do sinal é limitada.

Diacilglicerol, inositol-trisfosfato e Ca^{2+} têm funções relacionadas como segundos mensageiros

Uma segunda classe ampla de GPCR se acopla por meio de uma proteína G a uma **fosfolipase C (PLC)** da membrana plasmática, a qual é específica para o fosfolípido de membrana fosfatidil-inositol-4,5-bisfosfato, ou PIP₂ (ver Figura 10-15). Quando um dos hormônios que agem por esse

mecanismo (Tabela 12-4) se liga ao receptor específico na membrana plasmática (**Figura 12-11**, etapa ❶), o complexo receptor-hormônio catalisa a troca de GDP por GTP em uma proteína G associada, **G_q** (etapa ❷), ativando-a de maneira muito semelhante à ativação de **G_s** pelo receptor adrenérgico (Figura 12-4). A **G_q** ativada ativa a PLC específica de PIP₂ (Figura 12-11, etapa ❸), que catalisa a produção de dois segundos mensageiros potentes (etapa ❹), **diacilglicerol** e **inositol-1,4,5-trisfosfato**, ou **IP₃** (não confundir com PIP₃, p. 463).



O inositol-trisfosfato, composto solúvel em água, difunde-se da membrana plasmática para o retículo endoplasmático (RE), onde se liga a canais de Ca^{2+} específicos controlados por IP₃, abrindo-os. A ação da bomba SERCA (p. 414) garante que a $[\text{Ca}^{2+}]$ no ER seja várias ordens de grandeza maior do que no citosol, de modo que, quando os canais de Ca^{2+} se abrem, o Ca^{2+} é despejado no citosol (Figura 12-11, etapa ❺) e os níveis citosólicos de $[\text{Ca}^{2+}]$ aumentam drasticamente para cerca de 10^{-6} M. Um dos efeitos da $[\text{Ca}^{2+}]$ elevada é a ativação da **proteína-cinase C (PKC; C para Ca^{2+})**. O diacilglicerol atua em conjunto com o Ca^{2+} na ativação da PKC, e, portanto, Ca^{2+} também age como segundo mensageiro (etapa ❻). A ativação envolve o afastamento de um domínio da PKC (o domínio do pseudossustrato) da posição que ocupa na região de ligação ao substrato da enzima, possibilitando que esta se ligue e fosforile as proteínas que contenham uma sequência-consenso para PKC – resíduos de Ser ou Thr inseridos em uma sequência de aminoácidos reconhecida pela PKC (etapa ❼). Existem diversas isoenzimas da PKC, cada uma com distribuição tecidual, especificidade para as proteínas-alvo e funções características. Os seus alvos incluem proteínas do citoesqueleto, enzimas e proteínas nucleares que regulam a expressão gênica. Em conjunto,

TABELA 12-4 Alguns sinais agem por meio de fosfolipase C, IP₃ ou Ca^{2+}

Acetilcolina [muscarínico M ₁]	Peptídeo liberador de gastrina	Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)
Agonistas α_1 -adrenérgicos	Glutamato	Serotonina [5-HT ₂]
Angiogenina	Hormônio liberador de gonadotrofina (GRH)	Hormônio liberador de tireotrofina (TRH)
Angiotensina II	Histamina [H ₁]	Hormônio antidiurético
ATP [P _{2x} , P _{2y}]	Luz (<i>Drosophila</i>)	
Auxina	Ocitocina	

Nota: os subtipos dos receptores estão entre colchetes; ver nota de rodapé da Tabela 12-3.

QUADRO 12-2 MÉTODOS FRET: Vendo a bioquímica em uma célula viva

Sondas fluorescentes geralmente são utilizadas para a detecção rápida de variações biológicas em células vivas isoladas. Essas sondas podem ser desenvolvidas de modo a informarem quase que instantaneamente (dentro de nanossegundos) as variações nas concentrações celulares de um segundo mensageiro ou na atividade de uma proteína-cinase. Além disso, a microscopia de fluorescência apresenta resolução suficiente para revelar em qual local da célula essas alterações estão acontecendo. Em um procedimento amplamente utilizado, os marcadores fluorescentes são derivados de proteínas fluorescentes que ocorrem naturalmente, a **proteína fluorescente verde (GFP)**, descrita no Capítulo 9 (ver Figura 9-16), e suas variantes que fluorecem em diferentes espectros, produzidas por engenharia genética ou obtidas de vários celenterados marinhos. Por exemplo, na proteína fluorescente amarela (YFP, do inglês, *yellow fluorescent protein*), a Ala²⁰⁶ da GFP é substituída por um resíduo de Lys, alterando o comprimento de onda de absorção da luz e a fluorescência. Outras variantes da GFP têm fluorescência azul (BFP) ou ciano (CFP), e uma proteína relacionada tem fluorescência vermelha (mRFP1) (Figura Q-1). A GFP e suas variantes são estruturas compactas que mantêm a capacidade de se enovelarem em uma conformação nativa em barril β mesmo quando fusionadas a alguma outra proteína. Essas proteínas híbridas agem como réguas espectroscópicas para estimar as distâncias entre proteínas que interagem dentro da célula e, indiretamente, para estimar as concentrações locais de compostos que alterem as distâncias entre duas proteínas.

Uma molécula fluorescente excitada, como a GFP ou a YFP, pode gastar a energia do fóton absorvido de duas maneiras: (1) por fluorescência, emitindo um fóton com comprimento de onda levemente maior (menor

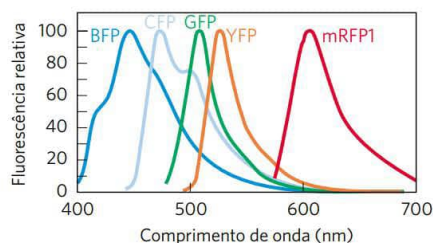


FIGURA Q-1 Espectro de emissão de algumas variantes da GFP.

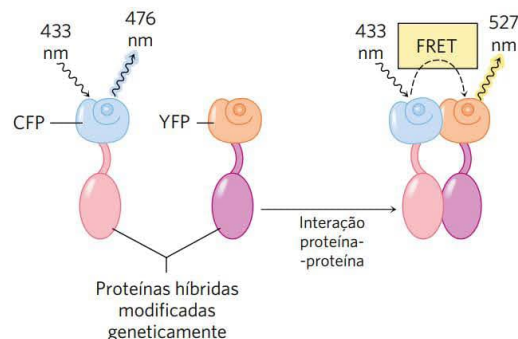


FIGURA Q-2 Quando a proteína doadora (CFP) é excitada com luz monocromática com comprimento de onda de 433 nm, ela emite luz fluorescente de 476 nm (à esquerda). Quando a proteína (em vermelho) fusionada à CFP e a proteína (em roxo) fusionada à YFP interagem, a CFP e a YFP ficam suficientemente próximas para permitir a transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET) entre elas. Agora, quando a CFP absorve luz de 433 nm, em vez de fluorescer a 476 nm, ela transfere a energia diretamente para a YFP, que, então, fluoresce em seu comprimento de onda de emissão característico, 527 nm. A relação entre a luz emitida a 527 e a 476 nm é, portanto, uma medida do quanto as proteínas vermelha e púrpura interagem entre si.

energia) do que o da luz excitante, ou (2) por **transfereência de energia por ressonância de fluorescência (FRET)**, na qual a energia da molécula excitada (o doador) passa diretamente a uma molécula próxima (o receptor) *sem a emissão de um fóton*, excitando o receptor (Figura Q-2). O receptor pode, então, decair ao estado fundamental por fluorescência; o fóton emitido tem um comprimento de onda maior (menor energia) do que o da luz excitante original e a emissão fluorescente do doador. Esse segundo modo de decaimento (FRET) é possível apenas quando doador e receptor estão próximos um do outro (dentro de 1 a 50 Å); a eficiência da FRET é inversamente proporcional a *sexta potência* da distância entre doador e receptor. Portanto, variações muito pequenas na distância entre doador e receptor são registradas como variações muito grandes na FRET, medida como a fluorescência emitida pela molécula receptora quando o doador é excitado. Com detectores de luz suficientemente sensíveis, este sinal fluorescente pode ser localizado em regiões específicas de uma célula viva isolada.

esta família de enzimas desempenha uma ampla variedade de ações na célula, afetando, por exemplo, a função neuronal e imune e a regulação da divisão celular. Substâncias que levam à superexpressão da PKA ou que aumentam a atividade para níveis anormais agem como promotores de tumores. Animais expostos a essas substâncias têm incidência maior de câncer.

O cálcio é um segundo mensageiro localizado no espaço e no tempo

Existem muitas variações do esquema básico de sinalização por Ca^{2+} . Em muitos tipos de células que respondem a sinais extracelulares, o Ca^{2+} age como um segundo mensageiro que inicia respostas intracelulares, como a exocitose

FRET tem sido utilizada para medir a [cAMP] em células vivas. O gene da GFP é fusionado com o gene da subunidade reguladora (R) da proteína-quinase dependente de cAMP (PKA) e o gene da BFP é fusionado ao gene da subunidade catalítica (C) (Figura Q-3). Quando essas duas proteínas híbridas são expressas em uma célula, a BFP (doador; excitação a 380 nm, emissão a 460 nm) e a GFP (aceptor; excitação a 475 nm, emissão a 545 nm) ficam suficientemente próximas na PKA inativa (tetrâmero R_2C_2) para ocasionarem FRET. Sempre que a [cAMP] celular aumenta, o complexo R_2C_2 dissocia-se em R_2 e 2 C, e o sinal de FRET é perdido, pois o doador e o aceitador estão agora muito distantes para haver uma FRET eficiente. Vista sob um microscópio de fluorescência, a região de [cAMP] mais alta apresenta um sinal da GFP mínimo e um sinal da BFP mais alto. A medida da relação

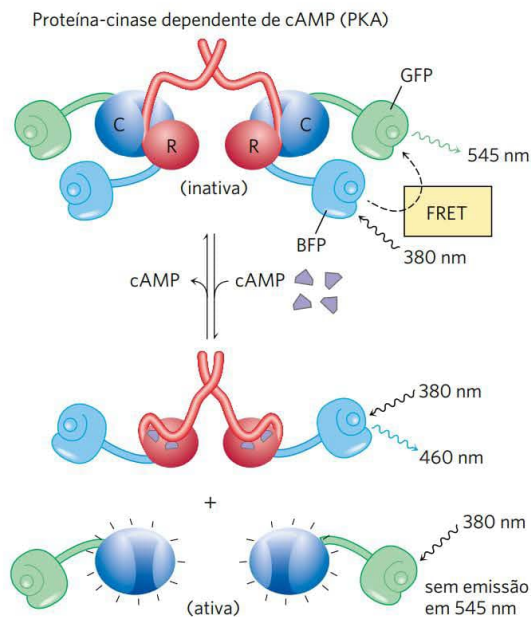


FIGURA Q-3 Medida da [cAMP] com FRET. A fusão de genes cria proteínas híbridas que exibem FRET quando as subunidades reguladora (R) e catalítica (C) da PKA estão associadas (baixa [cAMP]). Quando a [cAMP] aumenta, as subunidades dissociam-se, e a FRET cessa. A razão entre a emissão a 460 nm (subunidades dissociadas) e a 545 nm (subunidades complexadas), portanto, fornece uma medida sensível da [cAMP].

entre a emissão a 460 nm e a 545 nm fornece uma medida sensível da variação na [cAMP]. Determinando essa razão em todas as regiões da célula, os pesquisadores produzem uma imagem com cores falsas da célula, na qual a relação, ou a [cAMP] relativa, está representada pela intensidade da cor. As imagens gravadas em determinados intervalos de tempo revelam as variações na [cAMP] ao longo do tempo.

Uma variação dessa tecnologia tem sido utilizada para medir a atividade da PKA em uma célula viva (Figura Q-4). Os pesquisadores criaram um alvo para a fosforilação pela PKA por meio da síntese de uma proteína híbrida que contém quatro elementos: YFP (aceptor); um peptídeo curto com um resíduo de Ser circundado pela sequência-consenso da PKA; um domínio de ligação fosfo-Ser (chamado de 14-3-3); e CFP (doador). Quando o resíduo de Ser não está fosforilado, o domínio 14-3-3 não tem afinidade por ele, e a proteína híbrida existe em uma forma estendida, com o doador e o aceitador muito afastados para que um sinal da FRET possa ser gerado. Sempre que a PKA estiver ativa dentro da célula, o resíduo de Ser da proteína híbrida é fosforilado, e o domínio 14-3-3 se liga à fosfo-Ser. Dessa maneira, YFP e CFP ficam próximas, e um sinal da FRET pode ser detectado com um microscópio de fluorescência, revelando a presença de PKA ativa.

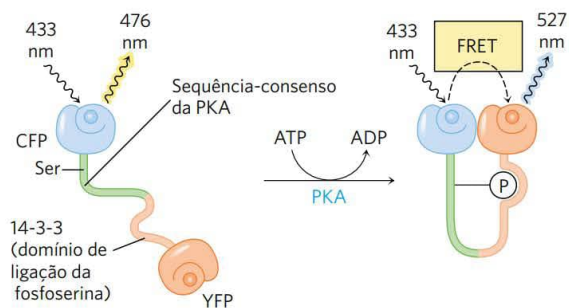


FIGURA Q-4 Medida da atividade da PKA com FRET. Uma proteína produzida por engenharia genética une YFP e CFP por meio de um peptídeo que contém (1) um resíduo de Ser circundado pela sequência-consenso para fosforilação pela PKA e contém (2) o domínio 14-3-3 de ligação à fosfo-Ser. A PKA ativada fosforila o resíduo de Ser, que se associa com o domínio de ligação 14-3-3, aproximando as proteínas fluorescentes o suficiente para permitir a ocorrência da FRET, revelando a presença de PKA ativa.

nos neurônios e nas células endócrinas, a contração nos músculos e os rearranjos do citoesqueleto durante o movimento ameboide. Nas células não estimuladas, a $[Ca^{2+}]$ citosólica é mantida muito baixa ($< 10^{-7}$ M) por meio da ação de bombas de Ca^{2+} localizadas no RE, na mitocôndria e na membrana plasmática (como discutido em mais detalhes a seguir). Estímulos hormonais, neuronais ou outros estímu-

los causam o influxo de Ca^{2+} para dentro da célula através de canais de Ca^{2+} específicos da membrana plasmática, ou causam a liberação do Ca^{2+} sequestrado no RE ou na mitocôndria, elevando, em qualquer um dos casos, a $[Ca^{2+}]$ citosólica e iniciando uma resposta celular.

Variações na $[Ca^{2+}]$ intracelular são detectadas por proteínas ligantes de Ca^{2+} que regulam uma grande variedade

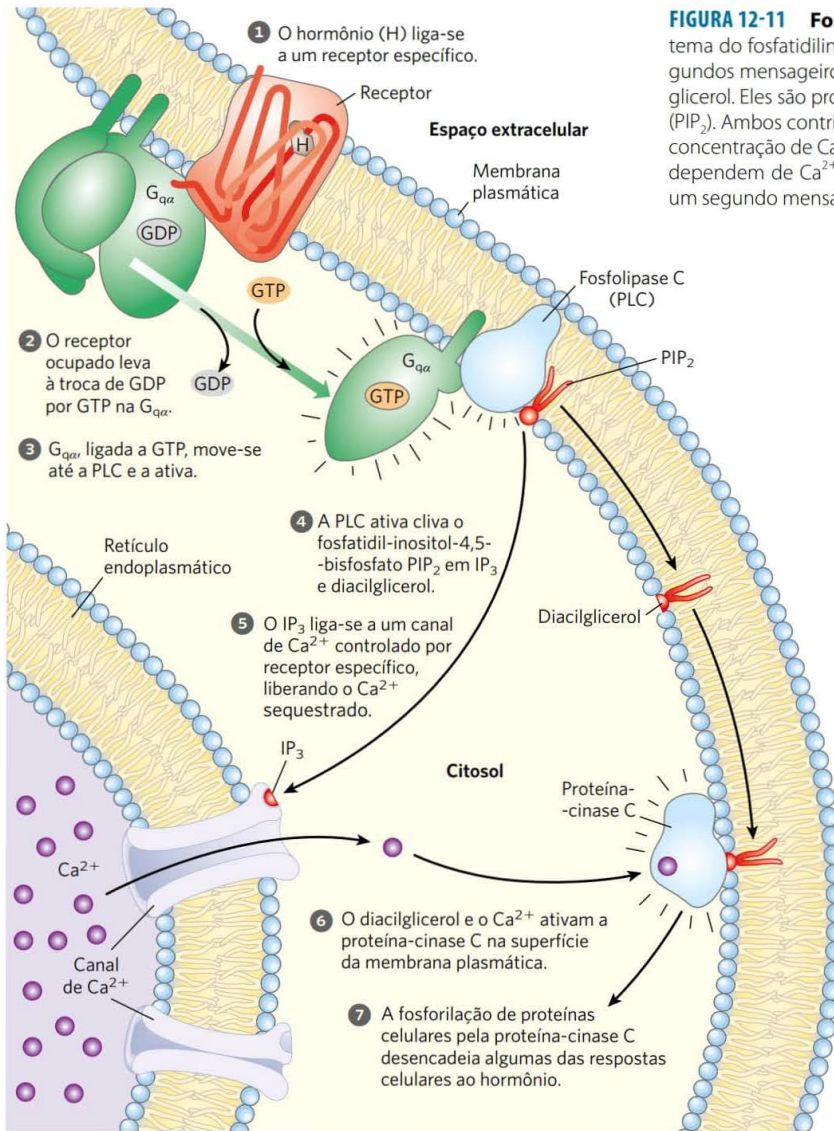


FIGURA 12-11 Fosfolipase C ativada por hormônios e IP_3 . No sistema do fosfatidilinositol sensível a hormônios são produzidos dois segundos mensageiros intracelulares: 1,4,5-inositol-trisfosfato (IP_3) e diacilglicerol. Eles são produtos da clivagem do fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP_2). Ambos contribuem para ativar a proteína-quinase C. Ao aumentar a concentração de Ca^{2+} no citosol, o IP_3 também ativa outras enzimas que dependem de Ca^{2+} e, consequentemente, o Ca^{2+} também atua como um segundo mensageiro.

de enzimas dependentes de Ca^{2+} . A **calmodulina** (CaM; M_r 17.000) é uma proteína ácida com quatro sítios que ligam Ca^{2+} com alta afinidade. Quando a $[Ca^{2+}]$ intracelular aumenta para cerca de 10^{-6} M (1 μ M), a ligação do Ca^{2+} induz mudança conformacional na proteína (**Figura 12-12a**). A calmodulina associa-se com diversas proteínas e, no estado ligado ao Ca^{2+} , modula as atividades dessas proteínas (**Figura 12-12b**). A calmodulina pertence à família de proteínas de ligação ao Ca^{2+} , que também inclui a troponina (ver **Figura 5-32**), que inicia a contração do músculo esquelético em resposta à elevação na $[Ca^{2+}]$. Os membros dessa família possuem uma estrutura característica de ligação a Ca^{2+} , a mão EF (**Figura 12-12c**).

A calmodulina é uma subunidade integrante da **proteína-quinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina (CaM-quinase)**, tipos I a IV). Quando a $[Ca^{2+}]$ intracelular aumenta em resposta a um estímulo, a calmodulina liga Ca^{2+} , sofre uma mudança na conformação e ativa a CaM-quinase.

A cinase, então, fosforila enzimas-alvo, regulando as suas respectivas atividades. A calmodulina também é uma subunidade de regulação da cinase da fosforilase *b* do músculo, que é ativada por Ca^{2+} . Desse modo, o Ca^{2+} inicia as contrações musculares que necessitam de ATP ao mesmo tempo em que ativa a degradação do glicogênio, fornecendo combustível para a síntese de ATP. Muitas outras enzimas também são moduladas por Ca^{2+} por meio da calmodulina (**Tabela 12-5**). A atividade do segundo mensageiro Ca^{2+} , assim como a do cAMP, pode ser limitada a um espaço. Depois que sua liberação inicia uma resposta local, o Ca^{2+} geralmente é removido antes que possa se difundir para regiões mais distantes da célula.

Com muita frequência, o nível de Ca^{2+} não apenas aumenta e então diminui, mas, em vez disso, oscila durante um período de alguns segundos (**Figura 12-13**), mesmo que a concentração extracelular do hormônio que desencadeia a resposta permaneça constante. Supõe-se que

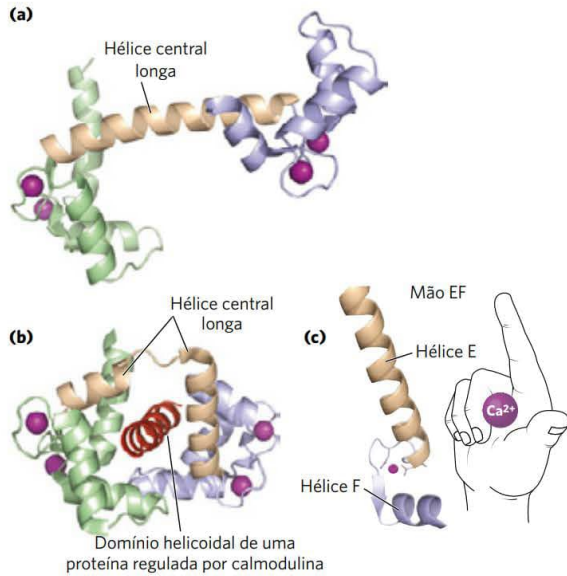


FIGURA 12-12 Calmodulina. A calmodulina é a proteína que faz a intermediação nas reações enzimáticas estimuladas por Ca^{2+} . A calmodulina tem quatro sítios de ligação para Ca^{2+} ($K_d \approx 0,1$ a $1 \mu\text{M}$). **(a)** Modelo em fita da estrutura da calmodulina cristalizada. Os quatro sítios de ligação a Ca^{2+} estão ocupados por Ca^{2+} (em roxo). O domínio aminoterminal está à esquerda, e o domínio carboxiterminal, à direita. **(b)** Calmodulina associada por um domínio helicoidal a uma das muitas enzimas que ele regula: proteína-cinase II dependente de calmodulina. Observe que a longa α -hélice central da calmodulina, visível em (a), dobra-se para trás com a ligação do domínio helicoidal do substrato. A hélice central da calmodulina é nitidamente mais flexível em solução do que no cristal. **(c)** Cada um dos quatro sítios de ligação a Ca^{2+} ocorre como um motivo hélice-alça-hélice, denominado mão EF, que também é encontrado em muitas outras proteínas que ligam Ca^{2+} . [Fontes: (a) PDB ID 1CLL, R. Chattopadhyaya et al., *J. Mol. Biol.* 228:1177, 1992. (b, c) PDB ID 1CDL, W. E. Meador et al., *Science* 257:1251, 1992.]

TABELA 12-5 Algumas proteínas reguladas por Ca^{2+} e calmodulina

Adenilil-ciclase (cérebro)
Proteína-cinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina (CaM-cinase I e IV)
Canal de Na^+ dependente de Ca^{2+} (<i>Paramecium</i>)
Canal que libera Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático
Calcineurina (fosfoproteína-fosfatase 2B)
cAMP-fosfodiesterase
Canal olfatório regulado por cAMP
Canal de Na^+ regulado por cGMP, canais de Ca^{2+} (bastonetes e cones)
Glutamato Descarboxilase
Cinases da cadeia leve da miosina
NAD^+ -cinase
Óxido nítrico-sintase
Fosfatidilinositol-3-cinase
ATPase Ca^{2+} dependente de cálcio da membrana plasmática (bomba de Ca^{2+})
RNA-helicase (p68)

o mecanismo que origina as oscilações na $[\text{Ca}^{2+}]$ envolve regulação por retroalimentação por Ca^{2+} em alguma parte do processo de liberação de Ca^{2+} . Qualquer que seja o mecanismo, o efeito é que um tipo de sinal (p. ex., concentração de hormônio) é convertido em outro (frequência e amplitude de pulsos de $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular). O sinal do Ca^{2+} decresce à medida que o íon se difunde para longe da fonte inicial (canal de Ca^{2+}), é sequestrado no RE ou é bombeado para fora da célula.

Existe uma interconexão significativa entre os sistemas de sinalização por Ca^{2+} e por cAMP. Em alguns tecidos, tanto a enzima que produz cAMP (adenilil-ciclase) quanto a enzima que degrada cAMP (fosfodiesterase) são estimuladas por Ca^{2+} . Variações espaciais e temporais na

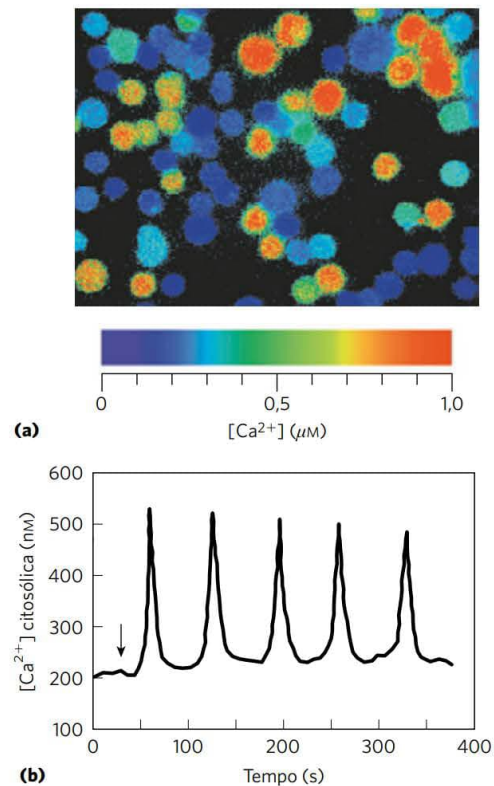


FIGURA 12-13 Sinais extracelulares disparam oscilações intracelulares de $[\text{Ca}^{2+}]$. **(a)** Um corante (denominado fura) que mostra alterações na fluorescência quando se liga ao Ca^{2+} se difunde para dentro das células, e a instantânea emissão de luz é medida por microscopia de fluorescência. A intensidade da fluorescência está representada pela cor, e a escala de cores relaciona intensidade com $[\text{Ca}^{2+}]$, possibilitando que se determine a concentração absoluta de $[\text{Ca}^{2+}]$. Neste caso, timócitos (células do timo) foram estimulados com ATP extracelular, o que eleva a $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular. As células são heterogêneas nas respostas. Algumas têm alta $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular (em vermelho) e outras têm $[\text{Ca}^{2+}]$ muito menor (em azul). **(b)** Quando uma sonda dessas é utilizada em um único hepatócito, o agonista noradrenalina (adicionado na flecha) provoca oscilações na $[\text{Ca}^{2+}]$ de 200 a 500 nM. Oscilações similares são induzidas em outros tipos de células por outros sinais extracelulares. [Fontes: (a) cortesia de Michael D. Cahalan, Department of Physiology and Biophysics, University of California, Irvine. (b) T. A. Rooney et al., *J. Biol. Chem.* 264:17,131, 1989.]

[Ca²⁺] podem, portanto, produzir variações transitórias e localizadas na [cAMP]. Anteriormente, foi mencionado que a PKA, a enzima que responde ao cAMP, geralmente é parte de um complexo supramolecular altamente localizado, agrupado sobre proteínas de ancoragem, como as AKAP. Essa localização subcelular das enzimas-alvo, combinada aos gradientes espaciais e temporais nas [Ca²⁺] e na [cAMP], permite que a célula responda a diferentes sinais por meio de variações metabólicas sutis, localizadas no tempo e no espaço.

RESUMO 12.2 Receptores associados a proteínas G e segundos mensageiros

- Os receptores associados a proteínas G (GPCR) possuem em comum um arranjo estrutural com sete hélices transmembrana e agem por meio de proteínas G heterotríméricas. Na ligação do ligante, a GPCR catalisa a troca de GDP por GTP na proteína G, causando a dissociação da subunidade G_α; G_α, então, estimula ou inibe a atividade de uma enzima efetora, o que leva a alterações nas concentrações locais do produto (um segundo mensageiro).
- O receptor β-adrenérgico ativa uma proteína G estimuladora, G_s, ativando a adenilil-ciclase e elevando a concentração do segundo mensageiro cAMP. O cAMP estimula a fosforilação de enzimas-alvo importantes por meio da proteína-quinase dependente de cAMP, alterando as atividades dessas proteínas.
- As cascatas enzimáticas, nas quais uma única molécula de hormônio ativa um catalisador, que ativa outro catalisador, e assim por diante, resultam em uma grande amplificação do sinal, o que é característico dos sistemas de receptores de hormônios.
- A concentração de cAMP é, ao final, reduzida pela cAMP-fosfodiesterase, e a proteína G_s se autodesliga por hidrolisar o GTP ligado a GDP, agindo como um comutador binário autolimitante.
- Enquanto o sinalizador adrenalina permanecer, a proteína-quinase específica para o receptor β-adrenérgico e a β-arrestina dessensibilizam temporariamente o receptor, o que o faz ir para vesículas intracelulares.
- Alguns receptores *estimulam* a adenilil-ciclase por meio de G_s; outros *inibem* por meio de G_i. Portanto, a [cAMP] celular reflete o efeito integrado de dois (ou mais) sinais.
- Proteínas adaptadoras não catalisadoras, como as AKAP, aproximam as proteínas envolvidas em processos de sinalização, aumentando a eficiência das interações e, em alguns casos, confinando o processo a uma localização subcelular específica.
- Alguns GPCR atuam por meio de uma fosfolipase C da membrana plasmática que cliva PIP₂ em diacilglicerol e IP₃. Pela abertura de canais de Ca²⁺ no retículo endoplasmático, o IP₃ eleva a [Ca²⁺] intracelular. O diacilglicerol e o Ca²⁺ agem em conjunto para ativar a proteína-quinase C, a qual fosforila proteínas celulares específicas e, assim, modula as respectivas atividades. A [Ca²⁺] também regula (frequentemente via calmodu-

lina) muitas outras enzimas e proteínas envolvidas em secreção, rearranjos do citoesqueleto ou contrações.

12.3 GPCR na visão, olfação e gustação

A detecção de luz, odores e sabores (visão, olfação e gustação, respectivamente) em animais é realizada por neurônios sensoriais especializados que utilizam mecanismos de transdução de sinal basicamente similares àqueles que detectam hormônios, neurotransmissores e fatores de crescimento. Um sinal sensorial inicial é amplificado enormemente por mecanismos que incluem canais iônicos controlados por portões e segundos mensageiros intracelulares. O sistema se adapta à estimulação contínua alterando sua sensibilidade ao estímulo (dessensibilização); e as informações sensoriais vindas de diversos receptores são integradas antes de o sinal final ser enviado ao cérebro.

O olho dos vertebrados utiliza mecanismos de GPCR clássicos

A transdução na visão (**Figura 12-14**) inicia-se quando a **rodopsina** recebe luz, a GPCR, presente na membrana dos discos dos bastonetes. Os bastonetes não detectam cores, e os cones, sim (ver a seguir). O pigmento que absorve luz (cromóforo), 11-*cis*-retinal, está ligado covalentemente à **opsina**, o componente proteico da rodopsina que fica próximo ao meio da bicamada da membrana dos discos. Quando um fóton é absorvido pelo retinal da rodopsina (etapa ①), a energia causa uma alteração fotoquímica; 11-*cis*-retinal é convertido a retinal-*trans* (ver Figuras 1-20b e 10-20). Essa mudança na estrutura do cromóforo força mudanças conformacionais na molécula de rodopsina, permitindo que ela interaja e, desse modo, ative a proteína G trimérica transducina. A rodopsina, então, estimula a troca do GDP ligado na transducina por GTP do citosol (Figura 12-14, etapa ②), e a transducina ativada estimula a proteína de membrana GMP cíclico (cGMP)-fosfodiesterase (PDE) por remover a subunidade inibitória (etapa ③). A cGMP-PDE degrada o segundo mensageiro 3',5'-cGMP a 5'-GMP, baixando a concentração de cGMP (etapa ④). Os canais de Na⁺ e de Ca²⁺ dependentes de cGMP existentes na membrana plasmática se fecham (etapa ⑤), ao passo que o antiporter Na⁺-Ca²⁺ continua a bombear Ca²⁺ para fora pela membrana plasmática (etapa ⑥), fazendo o potencial elétrico transmembrana ser mais negativo dentro da célula (i.e., hiperpolariza o bastonete). Essa mudança elétrica passa por uma série de células nervosas especializadas para o córtex visual do cérebro.

Algumas das etapas do processo de transdução visual provocam uma gigantesca amplificação do sinal. Cada molécula de rodopsina que é ativada ativa ao menos 500 moléculas de transducina e cada molécula de transducina pode ativar uma molécula de cGMP-PDE. Essa fosfodiesterase tem uma velocidade de processamento extraordinariamente alta: cada molécula ativada hidrolisa 4.200 moléculas de cGMP por segundo. A ligação de cGMP aos canais iônicos dependentes de cGMP é cooperativa, e uma variação relativamente pequena na [cGMP], portanto, provoca uma grande alteração da condutância iônica. O resultado dessas ampli-

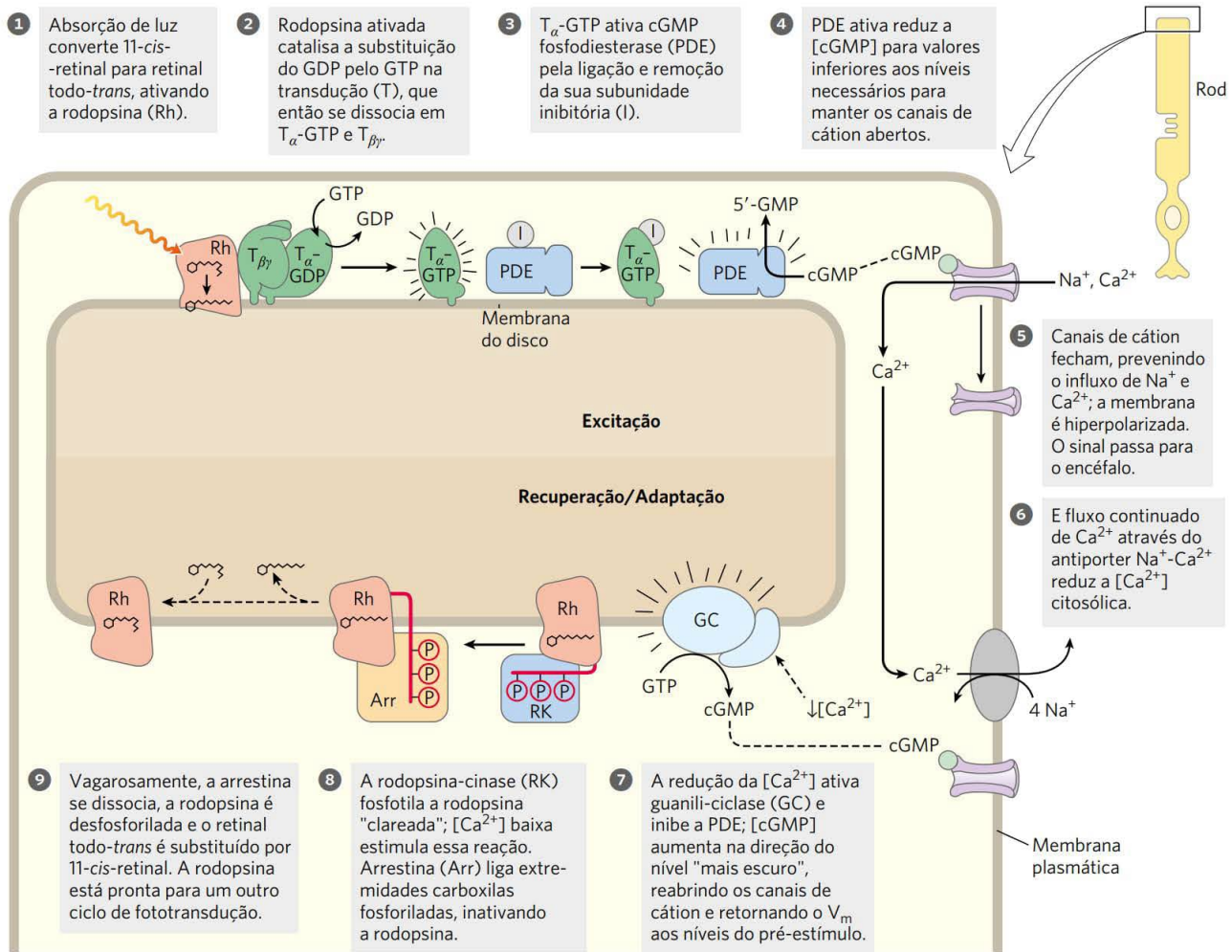


FIGURA 12-14 Consequências moleculares da absorção do fóton pela rodopsina no segmento externo do bastonete. A metade superior da figura (etapas 1 a 5) descreve a excitação. A metade inferior mostra as etapas após a iluminação: a recuperação (etapas 6 e 7) e a adaptação (etapas 8 e 9).

ficações é uma impressionante sensibilidade à luz. A absorção de um único fóton fecha 1.000 canais iônicos de Na^+ e Ca^{2+} , hiperpolarizando o potencial da membrana celular (V_m) em cerca de 1 mV.

À medida que os olhos do leitor se movem ao longo desta linha, as imagens na retina das primeiras palavras desaparecem rapidamente, antes mesmo de ver a próxima série de palavras. Nesse curto intervalo, muitos fenômenos bioquímicos aconteceram. Muito rapidamente após o término da iluminação dos bastonetes ou cones, o sistema fotossensível se desliga. A subunidade α da transducina (T_α , a subunidade que liga GTP) tem uma atividade GTPase intrínseca. Milissegundos após a intensidade luminosa diminuir, a GTP é hidrolisada, e T_α se associa novamente com a $T_\beta\gamma$. A subunidade inibitória da PDE, que está ligada a T_α -GTP, é liberada e se associa novamente com a PDE, inibindo fortemente a sua atividade, e, assim, a velocidade da quebra de cGMP diminui.

Ao mesmo tempo, um segundo fator que ajuda a terminar a resposta à luz é a redução da $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular decorrente do efluxo de Ca^{2+} através do antiporter Na^+ - Ca^{2+} (Figura 12-14, etapa 6). A alta $[\text{Ca}^{2+}]$ inibe a enzima que produz cGMP (guanilato-ciclase; etapa 7), de modo que a produção de cGMP aumenta quando a $[\text{Ca}^{2+}]$ cai e, então, volta aos níveis de antes do estímulo.

Em resposta à iluminação prolongada, a rodopsina, por si só, sofre mudanças que limitam a duração da sua atividade sinalizadora. A mudança conformacional induzida na rodopsina pela absorção de luz expõe vários resíduos de Thr e Ser no domínio carboxiterminal, os quais são fosforilados pela **rodopsina-cinase** (etapa 8), que é funcional e estruturalmente homóloga a β -adrenérgico-cinase (β ARK), que dessensibiliza o receptor β -adrenérgico. O domínio carboxiterminal fosforilado da rodopsina é ligado pela proteína **arrestina 1**, impedindo a interação entre a rodopsina ativada e a transducina. A arrestina 1 é um homólogo muito

próximo da arrestina 2 (β arr) do sistema β -adrenérgico. Em uma escala de tempo muito maior (etapa 9), o todo-*trans*-retinal ligado à rodopsina irradiada pela luz é removido e substituído por 11-*cis*-retinal, deixando a rodopsina pronta para detectar um novo próton.

A visão das cores envolve uma via de transdução sensorial nos cones essencialmente idêntica à descrita para os bastonetes, mas desencadeada por receptores de luz diferentes. Três tipos de cones são especializados na detecção da luz de diferentes regiões do espectro, utilizando três proteínas fotorreceptoras relacionadas (opsinas). Cada cone expressa somente um tipo de opsina, mas cada uma dessas células está estreitamente relacionada à rodopsina em tamanho, sequência de aminoácidos e, supõe-se, estrutura tridimensional. As diferenças entre as opsinas, entretanto, são grandes o bastante para colocar o cromóforo, 11-*cis*-retinal, em três ambientes levemente diferentes, com o resultado que os três fotorreceptores apresentam espectros de absorção diferentes (Figura 12-15). Cores e tons são diferenciados por meio da integração das informações vindas dos três tipos de cones, cada um contendo um dos três tipos de receptores.



O daltonismo, ou seja, a incapacidade de distinguir entre vermelho e verde, é uma característica genética hereditária relativamente comum nos seres humanos. Os diversos tipos de daltonismo são o resultado de diferentes tipos de mutações na opsina. Uma das formas é devida à perda do fotorreceptor para vermelho; os indivíduos afetados são **dicromatas vermelho** (enxergam apenas duas das cores primárias). Outros não possuem o pigmento verde e são **dicromatas verde**. Em alguns casos, os fotorreceptores para vermelho e verde estão presentes, mas apresentam uma alteração na sequência de aminoácidos que causa

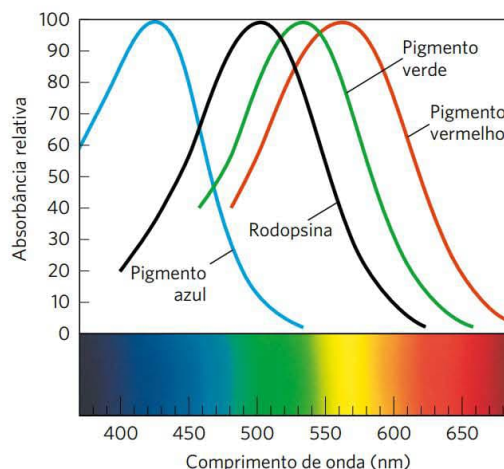


FIGURA 12-15 O espectro de absorção da rodopsina purificada e dos receptores para vermelho, verde e azul dos cones. Os espectros dos receptores, obtidos a partir de cones individuais isolados de cadáveres, apresentam picos em cerca de 420, 530 e 560 nm, e a absorção máxima da rodopsina é de aproximadamente 500 nm. Para referência, o espectro visível dos seres humanos é de cerca de 380 a 750 nm. [Fonte: dados de J. Nathans, *Sci. Am.* 260 (February):42, 1989.]

uma mudança no espectro de absorção, resultando em visão anormal das cores. Dependendo de qual pigmento estiver alterado, os indivíduos são **tricromatas com anomalia para o vermelho** ou **tricromatas com anomalia para o verde**. O estudo dos genes dos receptores visuais possibilitou o diagnóstico do daltonismo em um famoso “paciente” mais de um século após a sua morte (Quadro 12-3). ■

QUADRO 12-3



MEDICINA

Daltonismo: o experimento de John Dalton após a sua morte

O químico John Dalton (famoso pela teoria atômica) era daltônico. Ele imaginava ser provável que o humor vítreo de seus olhos (o fluido que preenche o globo ocular atrás do cristalino) fosse de cor azulada, diferentemente do fluido incolor dos olhos normais. Ele propôs que, após sua morte, seus olhos fossem dissecados, e a cor do humor vítreo, determinada. Seu desejo foi cumprido. No dia seguinte à morte de Dalton, em julho de 1844, Joseph Ransome dissecou os olhos e descobriu que o humor vítreo era perfeitamente incolor. Ransome, como muitos outros cientistas, ficou relutante em jogar as amostras no lixo. Ele colocou os olhos de Dalton em um frasco com preservativo, onde permaneceram por um século e meio (Figura Q-1).

Então, na metade da década de 1990, biólogos moleculares na Inglaterra retiraram pequenas amostras das retinas de Dalton e extraíram o DNA. Utilizando as sequências conhecidas dos genes das opsinas dos receptores para luz vermelha e verde, eles amplificaram as sequências relevantes (utilizando as técnicas descritas



FIGURA Q-1 Os olhos de Dalton. [Fonte: Professor J. D. Mollon, Department of Experimental Psychology, Cambridge University.]

no Capítulo 8) e determinaram que Dalton tinha o gene da opsina para o fotorpigmento vermelho, mas não tinha o gene da opsina para o fotorpigmento verde. Dalton era um dicromata verde. Assim, 150 anos depois de sua morte, o experimento que Dalton iniciou, conjecturando sobre a causa de seu daltonismo, foi finalmente terminado.

A olfação e a gustação dos vertebrados utilizam mecanismos similares aos do sistema visual

As células sensoriais que detectam odores e sabores têm muito em comum com os receptores do sistema visual. A ligação de uma molécula odorífica ao seu GPCR dispara uma mudança na conformação do receptor que ativa a proteína G, G_{olf} , análoga à transducina e à G_s do sistema β -adrenérgico. G_{olf} ativa a adenilil-ciclase, aumentando a concentração local de [cAMP]. Os canais de Na^+ e Ca^{2+} dependentes de cAMP da membrana ciliar se abrem, e a entrada de Na^+ e Ca^{2+} causa uma pequena despolarização, chamada de **potencial do receptor**. Se um número suficiente de moléculas odorantes encontra os receptores, o potencial do receptor será forte o bastante para induzir um neurônio a disparar um potencial de ação. Isso é transmitido ao cérebro em diversas etapas e registrado como um odor específico. Todos esses eventos acontecem em 100 a 200 ms. Quando o estímulo olfatório não está mais presente, a maquinaria de transdução se desliga de diferentes maneiras. Uma cAMP-fosfodiesterase retorna a [cAMP] ao mesmo nível existente antes do estímulo. A G_{olf} hidrolisa o GTP que tem ligado (produzindo GDP), portanto, inativa-se. A fosforilação do receptor por uma cinase específica impede que interaja com a G_{olf} , por um mecanismo análogo àquele utilizado para dessensibilizar o receptor β -adrenérgico e a rodopsina. Algumas moléculas odoríficas são detectadas por um mecanismo que foi visto em outras transduções de sinais: a ativação de fosfolipase e a produção de IP_3 , levando a um aumento intracelular na $[Ca^{2+}]$.

O sentido da gustação em vertebrados reflete a atividade dos neurônios gustatórios agrupados nas papilas gustatórias da superfície da língua. Por exemplo, o sabor doce vem de moléculas que se ligam nas papilas de sabor doce. Nos neurônios da sensação gustatória, os GPCRs estão acoplados a uma proteína G heterotrimérica, denominada de **gustaducina**. Quando as moléculas com sabor se ligam aos seus receptores, a gustaducina é ativada e estimula a produção de cAMP pela adenilil-ciclase. Isso leva à elevação da [cAMP], e, então, a PKA é ativada e, por sua vez, ela fosforila canais de K^+ da membrana plasmática que se fecham e enviam um sinal elétrico para o cérebro. Outras papilas gustatórias são especializadas na detecção de moléculas de sabor amargo, azedo, salgado ou umami (o sabor de certos aminoácidos, como o glutamato), utilizando várias combinações de segundos mensageiros e canais iônicos nos mecanismos de transdução.

Todos os sistemas GPCR possuem algumas características universais em comum

Até o presente momento, foram analisados diversos tipos de sistemas de sinalização (sinalização hormonal, visão, olfação e gustação), nos quais receptores de membrana estão acoplados, por meio de proteínas G, a enzimas que produzem segundos mensageiros. Como foi sugerido neste texto, os mecanismos de sinalização devem ter surgido nos primórdios da evolução. Estudos genômicos têm revelado centenas de genes codificando GPCR em vertebrados, em artrópodes (*Drosophila* e mosquito) e no nematódeo

TABELA 12-6 Alguns sinais que agem por meio de GPCR

Aminas	Hormônio liberador de triptofina
Acetilcolina (muscarínico)	Urotensina II
Dopamina	
Adrenalina	Hormônios proteicos
Histamina	Hormônio foliculo-estimulante
Serotonina	Gonadotrofina
	Hormônio Lutropina-corion-gonadotrófico
Peptídeos	Tireotrofina
Angiotensina	
Bombesina	Prostanoides
Bradicinina	Prostaciclina
Quimiocina(s)	Prostaglandina
Colecistocinina (CCK)	Tromboxano
Endotelina	
Hormônio liberador de gonadotrofina	Outros
Interleucina 8	Canabinoides
Melanocortina	Lisoesfingolípídeos
Neuropeptídeo Y	Melatonina
Neurotensina	Estímulos olfatórios
Orexina	Opioides
Somatostatina	Rodopsina
Taquicinina	

Caenorhabditis elegans. Mesmo a levedura *Saccharomyces* utiliza GPCRs e proteínas G para detectar o tipo oposto no acasalamento. Os padrões gerais têm sido conservados e a introdução de diversidade tem dado aos organismos modernos a capacidade de responderem a uma ampla gama de estímulos (Tabela 12-6). Dos aproximadamente 20 mil genes do genoma humano, cerca de 1.000 codificam GPCR, incluindo centenas para os estímulos do olfato e muitos “receptores órfãos” para os quais o ligante natural ainda não é conhecido.

Todos os sistemas de transdução de sinal bem estudados que agem por meio de proteínas G heterotriméricas possuem algumas propriedades comuns que refletem as suas relações evolutivas (**Figura 12-16**). Os receptores têm sete segmentos transmembrana, um domínio (geralmente a alça entre as hélices transmembrana 6 e 7) que interage com uma proteína G e um domínio carboxiterminal citoplasmático reversivelmente fosforilado em alguns resíduos de Ser ou Thr. O sítio de interação com o ligante (ou, no caso de recepção da luz, o receptor de luz) está profundamente inserido na membrana e é composto por resíduos de diferentes segmentos transmembrana. A interação com o ligante (ou a luz) induz uma alteração na conformação do receptor, expondo um domínio que pode interagir com uma proteína G. As proteínas G heterotriméricas ativam ou inibem as enzimas efetoras (adenilil-ciclase, PDE ou PLC), que afetam a concentração de um segundo mensageiro (cAMP, cGMP, IP_3 ou Ca^{2+}). Nos sistemas detectores de hormônios, o produto é uma proteína-cinase ativada que regula algum processo celular por meio da fosforilação de uma proteína fundamental àquele processo. Nos neurônios sensoriais, o produto é uma variação no potencial de membrana e um consequente

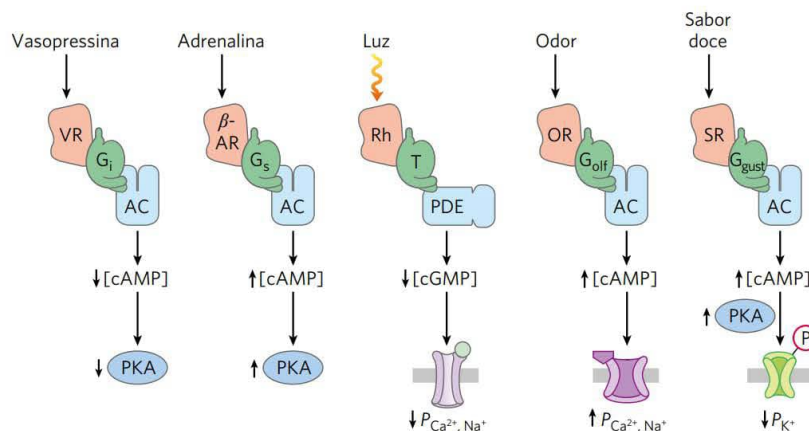


FIGURA 12-16 Características comuns dos sistemas de sinalização que detectam hormônios, luz, odores e sabores. Os GPCR garantem a especificidade ao sinal, e a interação com as proteínas G proporciona a amplificação do sinal. As proteínas G heterotrímicas ativam as enzimas efetoras: adenilil-ciclase (AC) e fosfodiesterases (PDE) que degradam cAMP ou cGMP. Mudanças nas concentrações de segundos mensageiros (cAMP, cGMP) resultam em mudanças nas atividades enzimáticas via fosforilação ou alterações na permeabilidade (P) da superfície das membranas a Ca^{2+} , Na^+ e K^+ . O resultado da despolarização ou hiperpolarização da célula sensorial (o sinal) passa através de um grupo de neurônios aos centros sensoriais do cérebro. Nos casos mais bem estudados, a dessensibilização inclui a fosforilação do receptor e a ligação de uma proteína (arrestina) que interrompe as interações entre receptor e proteína G. (A via da detecção de odores pela produção de IP_3 e aumento intracelular de $[\text{Ca}^{2+}]$ mencionada no texto não está mostrada.) VR é o receptor de vasopressina; β -AR, o receptor β -adrenérgico; Rh, rodopsina; OR, receptor olfatório; SR receptor do sabor doce.

sinal elétrico, que passa para outro neurônio da via que conecta a célula sensorial ao cérebro.

Todos esses sistemas são autoinativantes. O GTP é convertido a GDP pela atividade GTPásica intrínseca das proteínas G, geralmente aumentada pelas proteínas ativadoras de GTPase (GAP) ou proteínas RGS (reguladores da sinalização por proteínas G; ver Figura 12-5 e Figura Q-4 do Quadro 12-1). Em alguns casos, as enzimas efetoras que são os alvos da modulação pelas proteínas G também atuam como GAP. O mecanismo de dessensibilização que envolve a fosforilação da região carboxiterminal seguida pela ligação

da arrestina está distribuído amplamente nos mais diversos organismos e pode ser universal.

Cada um dos mil GPCR de vertebrados é expresso seletivamente em certos tipos de células e sob determinadas condições. Em conjunto, eles possibilitam que células e tecidos respondam a uma ampla gama de estímulos, incluindo várias aminas de baixo peso molecular, peptídeos, proteínas, eicosanoides e outros lipídeos, assim como a luz e muitas outras moléculas detectadas pela olfação e a gustação. A determinação da estrutura de vários GPCR por cristalografia (**Figura 12-17**), incluindo o receptor

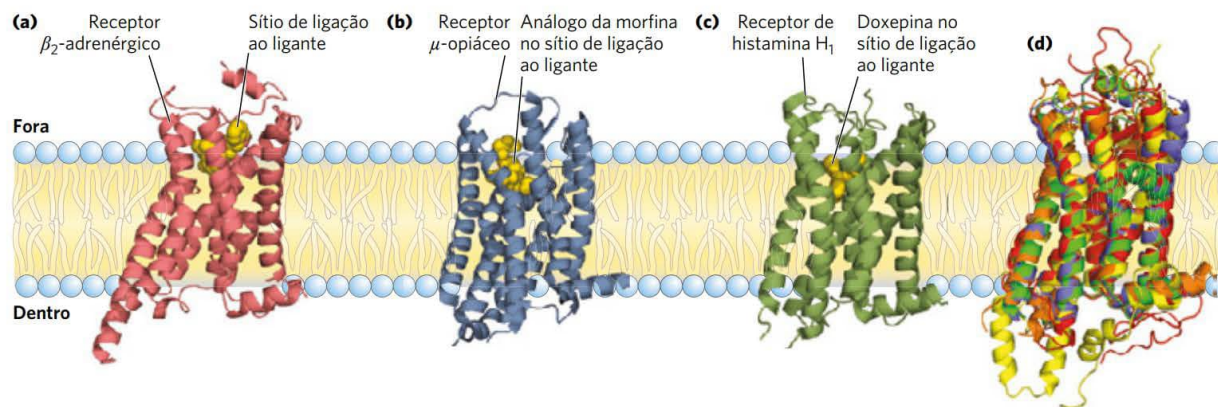


FIGURA 12-17 O receptor β -adrenérgico e vários outros GPCR. (a) O receptor β_2 -adrenérgico com o agonista adrenalina, mostrado em amarelo, no sítio de ligação ao ligante. (b) O receptor μ -opiáceo, o alvo da morfina e da codeína, com um análogo da morfina no sítio de ligação ao ligante. (c) O receptor H_1 da histamina ligado com o fármaco doxepina. (d) As estruturas de cinco GPCR sobrepostas para mostrar a extraordinária conservação da estrutura. Estão mostrados: receptor A2A da adenosina (em cor de laranja); receptor β_1 -adrenérgico de peru (em azul); receptor β_2 -adrenérgico humano (em verde); rodopsina de lula (em amarelo); rodopsina bovina (em vermelho). [Fontes: (a) PDB ID 3SN6, S. G. F. Rasmussen et al., *Nature* 477:549, 2011. (b) PDB ID 4DKL, A. Manglik et al., *Nature* 485:321, 2012. (c) PDB ID 3RZE, T. Shimamura et al., *Nature* 475:65, 2011. (d) Receptor A2A da adenosina humana: PDB ID 3EML, V. P. Jaakola et al., *Science* 322:1211, 2008; receptor β_1 -adrenérgico de peru: PDB ID 2VT4, A. Warne et al., *Nature* 454:486, 2008; receptor β_2 -adrenérgico humano: PDB ID 2RH1, V. Cherezov et al., *Science* 318:1258, 2007; rodopsina de lula: PDB ID 2Z73, M. Murakami e T. Kouyama, *Nature* 453:363, 2008; rodopsina bovina: PDB ID 1U19, T. Okada et al., *J. Mol. Biol.* 342:571, 2004.]

β -adrenérgico e o receptor de histamina, despertou grande interesse tanto nos mecanismos de transdução quanto nas possibilidades de alterar a atividade dos receptores por meio de fármacos. Esses dois receptores são os alvos de uma variedade de betabloqueadores e anti-histamínicos amplamente utilizados, respectivamente. As semelhanças estruturais entre os GPCR vão além do padrão comum de sete segmentos transmembrana. A Figura 12-17d mostra que as estruturas de cinco GPCR diferentes são quase completamente superponíveis. É evidente que algum fator na estrutura tridimensional os torna transdutores eficazes para muitos sinais diferentes.

RESUMO 12.3 GPCR na visão, olfação e gustação

- A visão, a olfação e a gustação dos vertebrados utiliza GPCR que agem por meio de proteínas G heterotrimerica para modificar o potencial de membrana (V_m) de nervos sensoriais.
- Nos bastonetes e nos cones da retina, a luz ativa a rodopsina, a qual ativa a proteína G transducina. A subunidade α liberada da transducina ativa uma fosfodiesterase de cGMP, que diminui a [cGMP] e, desse modo, fecha canais iônicos dependentes de cGMP no segmento externo do neurônio. A resultante hiperpolarização do bastonete ou cone conduz o sinal para o próximo neurônio da via, e, ao final, para o cérebro.
- Nos neurônios, o estímulo olfatório, agindo por meio de GPCR e proteínas G, dispara um aumento na [cAMP] (pela ativação da adenilil-ciclase) ou na $[Ca^{2+}]$ (pela ativação da PLC). Esses segundos mensageiros afetam canais iônicos e, portanto, o V_m .
- Os neurônios gustatórios têm GPCR que respondem a moléculas de sabor por meio da alteração nos níveis de cAMP, que altera V_m por meio do controle de canais iônicos.
- Existe um alto grau de conservação nas proteínas de sinalização e nos mecanismos de transdução entre os sistemas de sinalização e entre as espécies.

12.4 Receptores tirosinas-cinase

Os **receptores tirosinas-cinase (RTK)**, do inglês, *receptor tyrosine kinases*), uma grande família de receptores da membrana plasmática com atividade cinásica intrínseca, transduzem os sinais extracelulares por um mecanismo fundamentalmente diferente daquele dos GPCR. Os RTK têm um domínio de interação com o ligante na face extracelular da membrana plasmática e um sítio ativo enzimático na face citoplasmática, conectados por um único segmento transmembrana. O domínio citoplasmático é uma proteína-cinase que fosforila resíduos de Tyr (Tyr-cinase) em proteínas-alvo específicas. Os receptores de insulina e o fator de crescimento epitelial são protótipos desses cerca de 60 receptores presentes nos seres humanos.

A estimulação do receptor de insulina desencadeia uma cascata de reações de fosforilação de proteínas

A insulina regula tanto enzimas do metabolismo quanto a expressão gênica. Ela não entra nas células, mas inicia um

sinal que viaja, por uma rota ramificada, desde o receptor na membrana plasmática até as enzimas sensíveis à insulina no citosol e até o núcleo, onde estimula a transcrição de genes específicos. O receptor de insulina ativo (INSR) é formado por duas subunidades α idênticas que formam protuberâncias na face externa da membrana e duas subunidades β transmembrana com as extremidades carboxiterminais que formam protuberâncias na face citosólica da membrana, um dímero de monômeros $\alpha\beta$ (Figura 12-18). As subunidades α contêm o domínio de ligação à insulina, e os domínios intracelulares das subunidades β contêm a atividade proteína-cinase que transfere um grupo fosfato do ATP para o grupo hidroxila de resíduos de Tyr em proteínas-alvo específicas. A sinalização por meio do INSR é iniciada quando uma molécula de insulina se liga entre as duas subunidades do dímero, ativando, assim, a atividade Tyr-cinase. Cada subunidade β fosforila três resíduos de Tyr fundamentais próximos ao carboxiterminal da outra subunidade β . Essa **autofosforilação** expõe o sítio ativo da enzima, para que ela possa fosforilar os resíduos de Tyr em outras proteínas-alvo. O mecanismo de ativação da proteína-cinase do INSR é similar àquele descrito para PKA e PKC: uma região do domínio citoplasmático (sequência autoinibitória), que geralmente oclui o sítio ativo, afasta-se do sítio ativo após ser fosforilada, abrindo o sítio para a ligação de proteínas-alvo (Figura 12-18).

Quando INSR é autofosforilado (Figura 12-19, etapa 1) e se torna uma Tyr-cinase ativa, um dos alvos é o substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1; etapa 2). Uma vez fosforilado em alguns dos resíduos de Tyr, o IRS-1 torna-se o ponto de nucleação para um complexo de proteínas (etapa 3) que leva a mensagem do receptor de insulina para os alvos finais no citosol e no núcleo, utilizando uma longa série de proteínas intermediárias. Primeiro, um resíduo de fosfo-Tyr do IRS-1 liga-se ao **domínio SH2** da proteína Grb2. (SH2 é a abreviação de *Src homology 2* [homologia a SRC 2], assim denominado porque a sequência de um domínio SH2 é similar àquela da Src [pronuncia-se sarc], outra Tyr-cinase.) Muitas proteínas sinalizadoras possuem domínios SH2 e todos eles se ligam a resíduos de fosfo-Tyr nas proteínas com as quais interagem. Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2* [proteína ligada ao receptor do fator de crescimento]) é uma proteína adaptadora que não possui atividade enzimática própria. Tem como função aproximar duas proteínas (neste caso, IRS-1 e a proteína Sos) que devem interagir para que a transdução de sinal seja possível. Além do domínio SH2 (ligação de P-Tyr), a Grb2 também contém um segundo domínio de ligação à proteína, domínio SH3, que se liga a uma região rica em prolina da Sos, recrutando a Sos para o complexo do receptor que está se formando. Quando ligada a Grb2, a Sos atua como fator de troca de nucleotídeos de guanosina (GEF), catalisando a substituição do GDP ligado na proteína G Ras por GTP.

A **Ras** é o protótipo de uma família de **proteínas G pequenas** que controlam uma ampla variedade de transduções de sinal (ver Quadro 12-1). Como a proteína G trimérica que opera com o sistema β -adrenérgico (Figura 12-5), a Ras pode existir em uma conformação ligada a GTP (ativa) ou ligada a GDP (inativa), porém a Ras (~ 20 kDa) atua

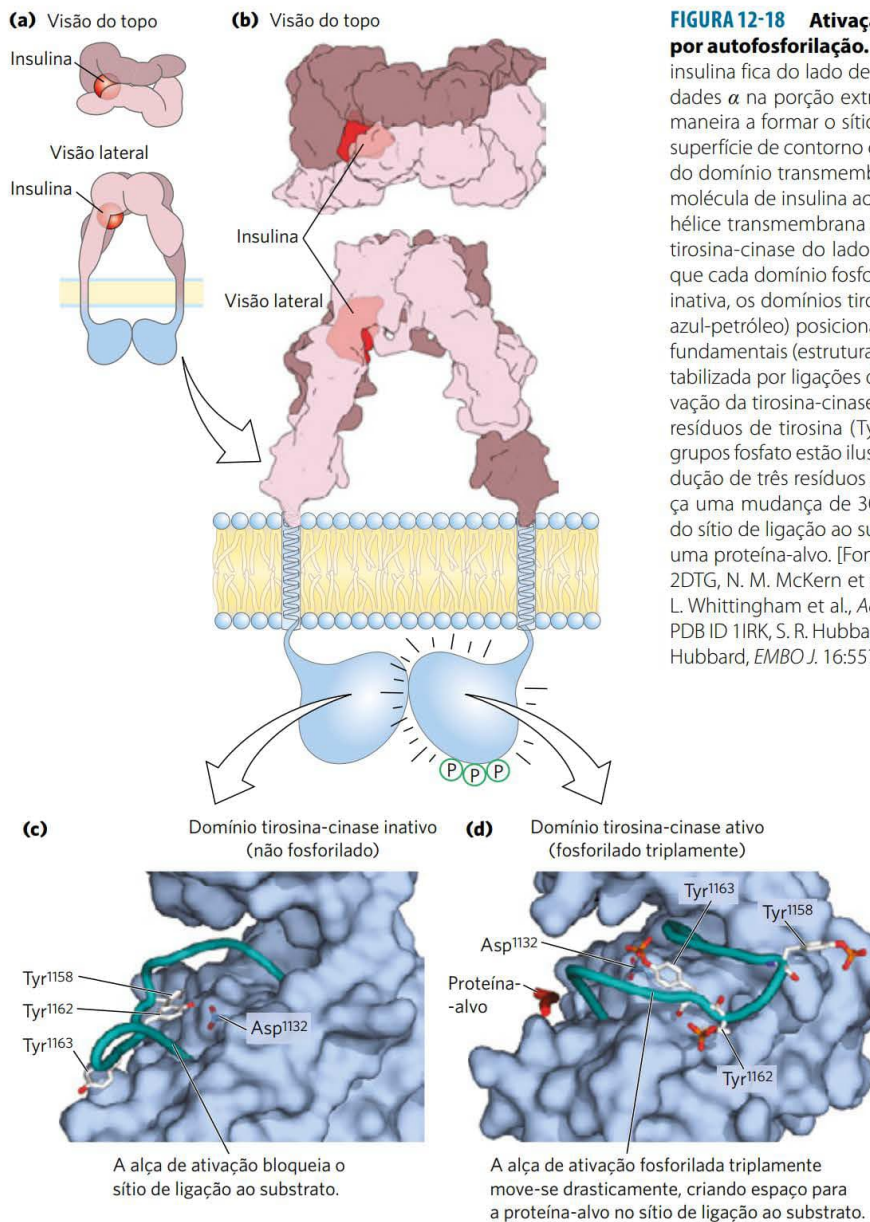


FIGURA 12-18 Ativação da tirosina-cinase do receptor de insulina por autofosforilação. (a) A região de ligação à insulina do receptor de insulina fica do lado de fora da célula e é formada por (b) duas subunidades α na porção extracelular e duas subunidades β entrelaçadas de maneira a formar o sítio de ligação à insulina (mostrado no modelo de superfície de contorno da estrutura cristalina). (A estrutura cristalográfica do domínio transmembrana ainda não foi resolvida.) A ligação de uma molécula de insulina ao receptor é comunicada por meio de uma única hélice transmembrana em cada subunidade β para o par de domínios tirosina-cinase do lado de dentro da célula, ativando a atividade para que cada domínio fosforile o outro em três resíduos de Tyr. (c) Na forma inativa, os domínios tirosina-cinase têm a alça (esqueleto mostrado em azul-petróleo) posicionada no sítio ativo e nenhum dos resíduos de Tyr fundamentais (estrutura em bastão) é fosforilado. Essa conformação é estabilizada por ligações de hidrogênio entre a Tyr¹¹⁶² e o Asp¹¹³². (d) A ativação da tirosina-cinase possibilita que cada subunidade β fosforile três resíduos de tirosina (Tyr¹¹⁵⁸, Tyr¹¹⁶², Tyr¹¹⁶³) na outra subunidade β . (Os grupos fosfato estão ilustrados em cor de laranja e em vermelho.) A introdução de três resíduos de tirosina fosforilada altamente carregados força uma mudança de 30 Å na posição da alça de ativação, afastando-a do sítio de ligação ao substrato, que fica disponível para ligar e fosforilar uma proteína-alvo. [Fontes: (b) receptor de insulina: derivado de PDB ID 2DTG, N. M. McKern et al., *Nature* 443:218, 2006; insulina: PDB ID 2CEU, J. L. Whittingham et al., *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 62:505, 2006. (c) PDB ID 1IRK, S. R. Hubbard et al., *Nature* 372:746, 1994. (d) PDB ID 1IR3, S. R. Hubbard, *EMBO J.* 16:5572, 1997.]

como monômero. Quando ligada ao GTP, a Ras pode ativar uma proteína-cinase, Raf-1 (Figura 12-19, etapa 4), a primeira de três proteínas-cinase – Raf-1, MEK e ERK, que formam uma cascata na qual cada cinase ativa a próxima por fosforilação (etapa 5). As proteínas-cinase MEK e ERK são ativadas pela fosforilação de um resíduo de Thr e de um resíduo de Tyr. Quando ativada, a ERK controla alguns dos efeitos biológicos da insulina, entrando no núcleo e fosforilando fatores de transcrição como o Elk1 (etapa 6), que modula a transcrição de aproximadamente 100 genes regulados pela insulina (etapa 7), alguns dos quais codificam proteínas essenciais para a divisão celular. Desse modo, a insulina atua como fator de crescimento.

As proteínas Raf-1, MEK e ERK são membros de três famílias maiores, para as quais têm sido utilizadas diversas nomenclaturas. ERK está na família das **MAPK** (do inglês, *mitogen-activated protein kinases* [proteínas-cinase ativadas por mitógenos]; mitógenos são sinais extracelulares que induzem mitose e divisão celular). Logo após a descoberta da primeira enzima MAPK, foi verificado que essa enzima era ativada por outra proteína-cinase, que foi então nomeada MAP-cinase-cinase (a MEK pertence a essa família). Quando uma terceira cinase que ativava a MAP-cinase-cinase foi encontrada, essa família de proteínas recebeu o jocoso nome de MAP-cinase-cinase-cinase (a Raf-1 está nessa família). As abreviações das três famílias são menos

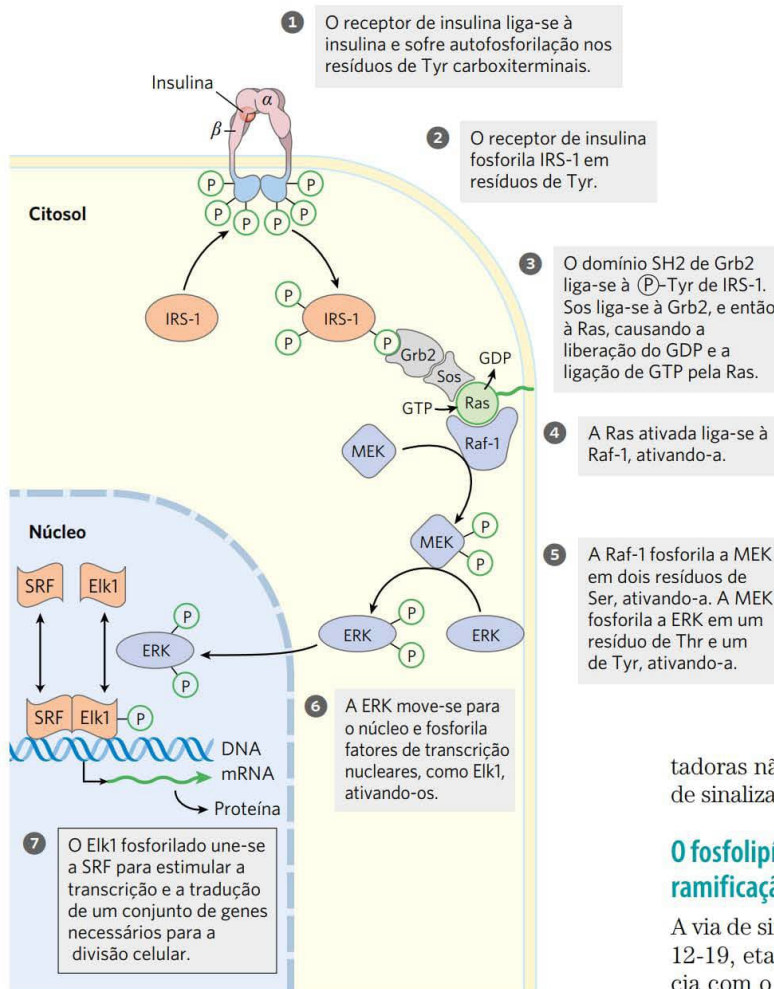


FIGURA 12-19 Regulação da expressão gênica pela insulina por meio de uma cascata de MAP-quinase. O receptor de insulina é formado por suas subunidades α situadas na face externa da membrana plasmática e duas subunidades β que atravessam a membrana e formam uma protuberância na face citoplasmática. A ligação da insulina à subunidade α dispara uma mudança conformacional que permite a autofosforilação de resíduos de tirosina no domínio carboxiterminal das subunidades β . A autofosforilação também ativa o domínio Tyr-quinase, que, então, catalisa a fosforilação de outras proteínas-alvo. A rota de sinalização por meio da qual a insulina regula a expressão de genes específicos envolve uma cascata de proteínas-quinase, em que cada uma delas ativa a seguinte. O INSR é uma proteína-quinase específica para Tyr; as outras cinases (todas mostradas em azul) fosforilam resíduos de Ser ou Thr. MEK é uma cinase com especificidade dupla, fosforila tanto resíduos de Thr e de Tyr na ERK (do inglês, *extracellular regulated kinase*). MEK (do inglês, *mitogen-activated kinase*) é ativada por agentes mitogênicos; ERK é ativada extracelularmente; e SRF (do inglês, *serum response factor*) é um fator de resposta do soro.

tadoras não enzimáticas para unir componentes de uma via de sinalização ramificada, as quais são apresentadas a seguir.

O fosfolípídeo de membrana PIP_3 age em uma ramificação da sinalização pela insulina

A via de sinalização da insulina ramifica-se em IRS-1 (Figura 12-19, etapa 2). Grb2 não é a única proteína que se associa com o IRS-1. A enzima fosfoinositídeo-3-quinase (PI3K) liga-se a IRS-1 através do domínio SH2 da PI3K (Figura 12-20). Assim ativada, a PI3K converte o lipídeo de membrana fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP_2) em fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato (PIP_3) pela transferência de um grupo fosforila do ATP. A cabeça polar do PIP_3 (com muitas cargas negativas) que se projeta da face citoplasmática da membrana plasmática é o ponto inicial para uma segunda ramificação da sinalização, envolvendo outra cascata de proteínas-quinase. Quando ligada a PIP_3 , a proteína-quinase B (PKB, também chamada de Akt) é fosforilada e ativada por outra proteína-quinase, a PDK1. A PKB ativada, então, fosforila resíduos de Ser ou Thr nas proteínas-alvo, uma das quais é a glicogênio-sintase-quinase (GSK3). Na forma ativa, não fosforilada, a GSK3 fosforila a glicogênio-sintase, inativando-a, e, desse modo, contribuindo para a redução na síntese de glicogênio. Esse mecanismo explica apenas parte dos efeitos da insulina no metabolismo do glicogênio (ver Figura 15-42). Quando fosforilada pela PKB, a GSK3 é inativada. Assim, impedindo a inativação da glicogênio-sintase no fígado e no músculo, a cascata de fosforilações de proteínas iniciada pela insulina estimula a síntese de glicogênio (Figura 12-20). Em uma terceira ramificação da sinalização nos tecidos muscular e adiposo, a PKB inicia o movimento, mediado por clatrina, dos transportadores de glicose

complicadas: MAPK, MAPKK e MAPKKK. As cinases das famílias MAPK e MAPKKK são específicas para resíduos de Ser ou Thr, e as MAPKK (nesse caso, a MEK) fosforilam um resíduo de Ser e um de Tyr do substrato, uma MAPK (nesse caso, a ERK).

Atualmente, os bioquímicos reconhecem essa via da insulina como parte de um esquema mais geral da sinalização por hormônios. Via com etapas semelhantes às mostradas na Figura 12-19 levam a mudanças na fosforilação de enzimas-alvo por proteínas-quinase ou fosfoproteínas-fosfatase. O alvo da fosforilação geralmente é outra proteína-quinase que, então, fosforila uma terceira proteína-quinase, e assim por diante. O resultado é uma cascata de reações que amplifica o sinal inicial em muitas ordens de magnitude (ver Figura 12-1b). As **cascatas das MAPK** (Figura 12-19) controlam a sinalização iniciada por diversos fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF, do inglês, *platelet-derived growth factor*) e o fator de crescimento da epiderme (EGF, do inglês, *epidermal growth factor*). Outra estratégia geral exemplificada pela via do receptor de insulina é a utilização de proteínas adap-

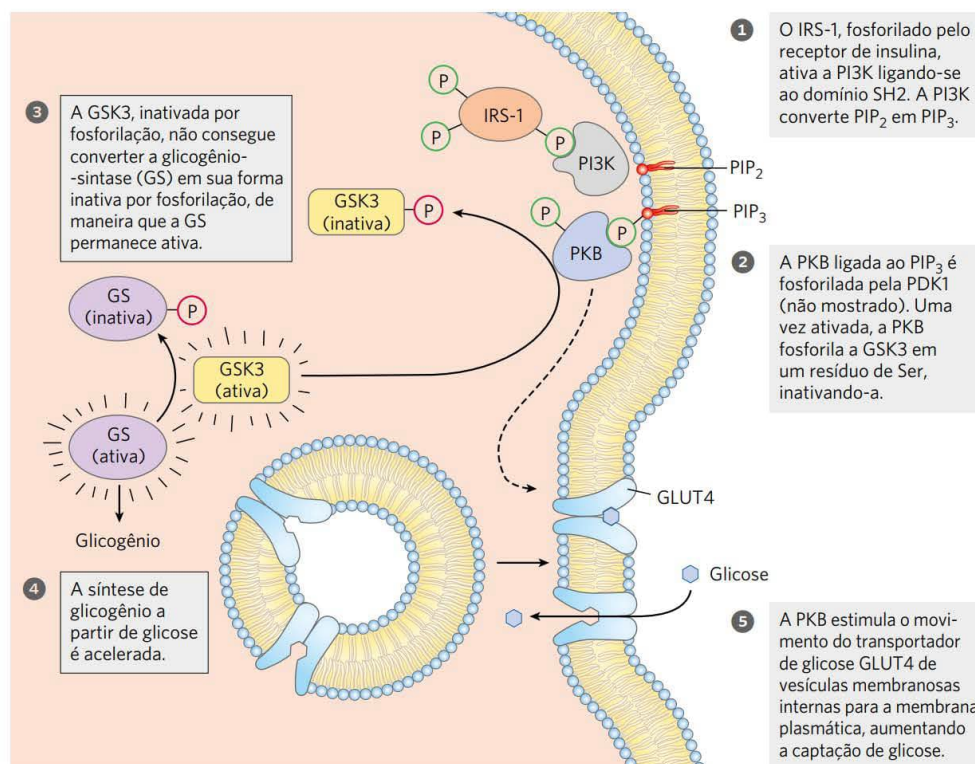


FIGURA 12-20 Ação da insulina na síntese de glicogênio e no movimento de GLUT4 para a membrana plasmática. A ativação da PI3-cinase (PI3K) pelo IRS-1 fosforilado sinaliza (por meio da proteína-cinase B, PKB) o movimento do transportador de glicose GLUT4 para a membrana plasmática e a ativação da glicogênio-sintase.

(GLUT4) de vesículas internas para a membrana plasmática, estimulando a captação da glicose da corrente sanguínea (Figura 12-20, etapa 5; ver também Quadro 11-1).



Como em todas as rotas de sinalização, existe um mecanismo para o término da atividade da via da PI3K-PKB. Uma fosfatase específica para PIP₃ (PTEN nos seres humanos) remove o grupo fosfato da posição 3 do PIP₃ e gera PIP₂, que não serve como sítio de ligação para a PKB, e, assim, a cadeia de sinalização é rompida. Em diversos tipos de câncer, o gene para a PTEN encontra-se mutado com frequência, levando a um circuito de regulação defeituoso e níveis anormalmente elevados de PIP₃ e de atividade da PKB. Isso leva a um sinal contínuo para que a célula se divida, o que, consequentemente, faz o tumor crescer. ■

O receptor de insulina é o protótipo de diversos receptores enzimáticos com estrutura similar e atividade de RTK (Figura 12-21). Os receptores para EGF e PDGF, por exemplo, apresentam semelhanças em estrutura e sequência com o INSR, e ambos têm uma atividade Tyr-cinase que fosforila IRS-1. Muitos desses receptores dimerizam após a interação com o ligante; o INSR é uma exceção, pois já é um dímero ($\alpha\beta$)₂ antes da ligação da insulina. (O promotor do receptor de insulina é uma unidade $\alpha\beta$.) A ligação de proteínas adaptadoras, como Grb2, a resíduos de fosfo-Tyr é um mecanismo comum para a promoção das interações proteína-proteína iniciadas pelos RTK, tópico que será novamente abordado na Seção 12.6.

Além dos muitos receptores que atuam como proteínas-cinase específicas para Tyr (os RTK), algumas proteínas de membrana semelhantes a receptores têm atividade de Tyr-fosfatase. Com base nas estruturas dessas proteínas, é possível deduzir que os seus ligantes são componentes da matriz extracelular ou moléculas da superfície de outras células. Ainda que as suas funções em sinalização não estejam tão bem compreendidas quanto as funções dos RTK, essas moléculas claramente têm o potencial para reverter as ações dos sinais que estimulam os RTK.

O que forçou a evolução de uma maquinaria de regulação tão complicada? Esse sistema permite que um receptor ativado ative diversas moléculas de IRS-1, amplificando o sinal da insulina, e possibilita a integração de sinais provenientes de diferentes receptores, como EGFR e PDGFR, cada um dos quais podendo fosforilar IRS-1. Além disso, como IRS-1 pode ativar qualquer uma das várias proteínas que contêm domínios SH2, um único receptor que atue por meio de IRS-1 pode iniciar duas ou mais rotas de sinalização; a insulina afeta a expressão gênica por meio da rota Grb2-Sos-Ras-MAPK e afeta o metabolismo do glicogênio e o transporte de glicose por meio da rota PI3K-PKB. Por fim, existem diferentes proteínas IRS estreitamente relacionadas (IRS2, IRS3), cada uma com distribuição nos diferentes tecidos e função características, ampliando ainda mais as possibilidades de sinalização em rotas iniciadas por RTK.

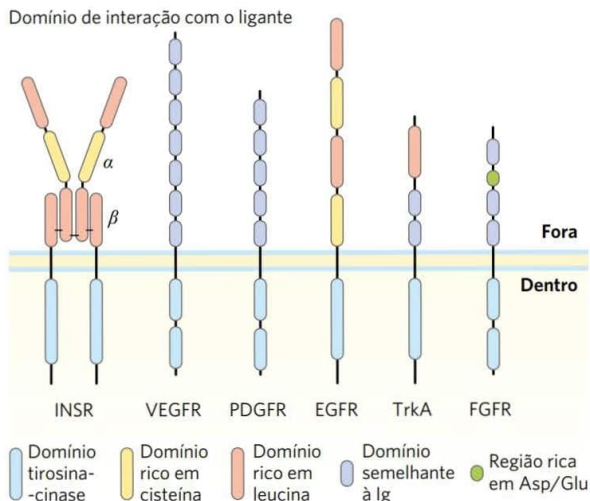


FIGURA 12-21 Receptores tirosinas-cinase. Entre os receptores de fatores de crescimento que sinalizam por meio da atividade de tirosina-cinase se incluem os receptores de insulina (INSR), o fator de crescimento vascular endotelial (VEGFR), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR), o fator de crescimento da epiderme (EGFR), o fator de crescimento neural de alta afinidade (TrkA) e o fator de crescimento de fibroblastos (FGFR). Todos esses receptores têm um domínio tirosina-cinase na face citoplasmática da membrana plasmática (em azul). O domínio extracelular é exclusivo para cada tipo de receptor, refletindo as especificidades dos diferentes fatores de crescimento. Esses domínios extracelulares são geralmente combinações de motivos estruturais, como segmentos ricos em cisteína ou ricos em leucina e segmentos que contêm um ou mais motivos encontrados nas imunoglobulinas (Ig). Muitos outros receptores desse tipo estão codificados no genoma humano, cada qual com domínio extracelular e especificidade para o ligante diferentes.

Interconexões entre sistemas de sinalização são comuns e complexas

Para simplificar, as vias de sinalização foram tratadas como sequências separadas de eventos que levam a consequências metabólicas independentes, porém, na verdade, há um

enorme cruzamento de informações entre os sistemas sinalizadores. O circuito de regulação que governa o metabolismo é ricamente entrelaçado e estratificado. As análises das vias de sinalização da insulina e da adrenalina foram feitas separadamente, porém elas não trabalham de modo independente. A insulina contrapõe os efeitos metabólicos da adrenalina na maioria dos tecidos e a ativação da via de sinalização da insulina atenua diretamente o sistema de sinalização do receptor β -adrenérgico. Por exemplo, a cinase do INSR fosforila diretamente dois resíduos de Tyr na porção citoplasmática do receptor β_2 -adrenérgico, e a PKB, ativada pela insulina (Figura 12-22), fosforila dois resíduos de Ser da mesma região. A fosforilação desses quatro resíduos desencadeia a internalização mediada por clatrina do receptor β_2 -adrenérgico, retirando-o da membrana plasmática e diminuindo a sensibilidade da célula à adrenalina. Um segundo tipo de troca de informações entre esses receptores ocorre quando os resíduos de tirosina fosforilada do receptor β_2 -adrenérgico, fosforilados pelo INSR, servem como pontos de nucleação para proteínas contendo domínios SH2, como a Grb2 (Figura 12-22, lado esquerdo). A ativação da MAPK ERK pela insulina (ver Figura 12-19) é de 5 a 10 vezes maior na presença do receptor β_2 -adrenérgico, supostamente devido a essa troca de informação. Os sistemas de sinalização que utilizam cAMP e Ca^{2+} também apresentam uma extensa interação. Cada um desses segundos mensageiros afeta a geração e a concentração do outro. Um dos maiores desafios da biologia de sistemas é elucidar os efeitos dessas interações nas respostas metabólicas como um todo de cada tecido, uma tarefa hercúlea.

RESUMO 12.4 Receptores tirosinas-cinase

- O receptor de insulina, INSR, é o protótipo dos receptores enzimáticos com atividade Tyr-cinase. Quando a insulina se liga ao receptor, cada unidade $\alpha\beta$ do INSR fosforila a subunidade β da outra unidade, ativando a atividade tirosina-cinase do receptor. A cinase catalisa a fosforilação de resíduos de Tyr em outras proteínas, como IRS-1.

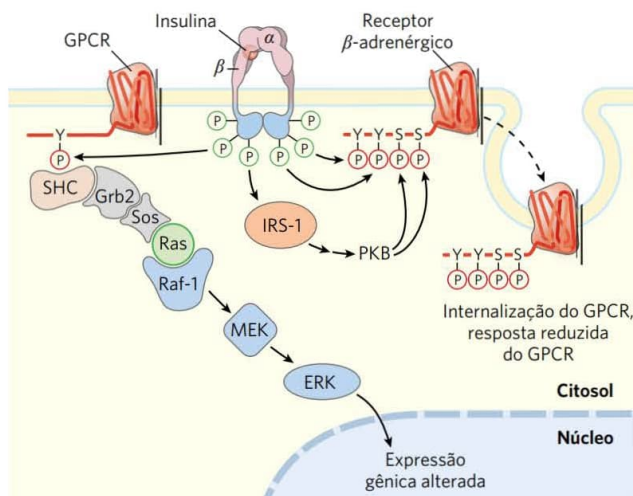
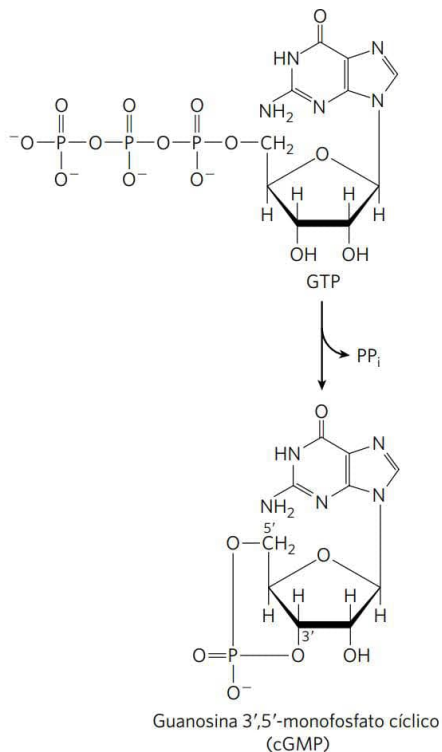


FIGURA 12-22 Troca de informações entre o receptor de insulina e o receptor β_2 -adrenérgico (e outros GPCR). Quando o INSR é ativado pela ligação com insulina, a atividade de tirosina-cinase fosforila o receptor β_2 -adrenérgico (lado direito) em dois resíduos de tirosina (Tyr³⁵⁰ e Tyr³⁶⁴) que se localizam próximos ao carboxiterminal e indiretamente (pela ativação da proteína-cinase B [PKB]; ver Figura 12-20) leva à fosforilação de dois resíduos de serina na mesma região. O efeito dessas fosforilações é a internalização do receptor adrenérgico, reduzindo a resposta ao estímulo adrenérgico. De modo alternativo (à esquerda), a fosforilação catalisada pelo INSR de um GPCR (um receptor adrenérgico ou outro receptor) em uma Tyr carboxiterminal cria o ponto de nucleação para a ativação da cascata das MAPK (ver Figura 12-19), com a Grb2 atuando como proteína adaptadora. Neste caso, o INSR utiliza o GPCR para intensificar seu próprio sinal.

- Os resíduos de tirosina fosforilada em IRS-1 servem como sítios de ligação para proteínas contendo domínios SH2. Algumas dessas proteínas, como a Grb2, têm dois ou mais domínios de ligação a proteínas e podem atuar como adaptadores que aproximam outras proteínas.
- A Sos ligada à Grb2 catalisa a troca GDP-GTP na Ras (uma proteína G pequena), a qual, por sua vez, ativa uma cascata de MAPK, que termina com a fosforilação de proteínas-alvo no citosol e no núcleo. O resultado são mudanças metabólicas específicas e alterações na expressão gênica.
- A enzima PI3K, ativada pela interação com IRS-1, converte o lipídeo de membrana PIP_2 em PIP_3 , tornando-o um ponto de nucleação para proteínas e uma segunda e terceira ramificações da via de sinalização da insulina.
- Existem extensas interconexões entre as rotas de sinalização, possibilitando a integração e a regulação exata de efeitos hormonais múltiplos.

12.5 Receptores guanilil-ciclase, cGMP e proteína-quinase G

As guanilil-ciclases (**Figura 12-23**) são receptores-enzimas que, quando ativados, convertem GTP no segundo mensageiro 3',5'-GMP cíclico (cGMP):



Muitas das ações do cGMP em animais são mediadas pela **proteína-quinase dependente de cGMP**, também chamada de **proteína-quinase G (PKG)**. Quando ativada por cGMP, a PKG fosforila resíduos de Ser e Thr em proteínas-alvo. Os domínios de regulação e catalítico dessa enzima es-

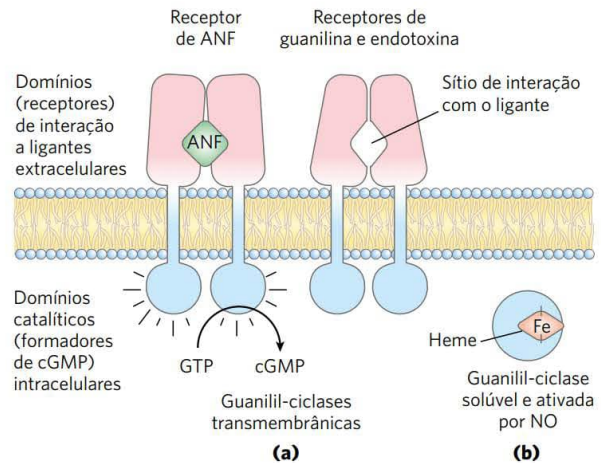


FIGURA 12-23 Dois tipos de guanilil-ciclase que participam da transdução de sinal. **(a)** Um tipo é um homodímero com um único segmento transmembrana em cada monômero, o qual conecta o domínio extracelular de interação com o ligante e o domínio intracelular da guanilato-ciclase. Os receptores desse tipo são utilizados para detectar dois ligantes extracelulares: o fator natriurético atrial (ANF; com receptores em células dos ductos coletores renais e do músculo liso vascular) e a guanilina (hormônio peptídico produzido no intestino, com receptores em células do epitélio intestinal). O receptor de guanilina também é alvo de uma toxina bacteriana que causa diarreia grave. **(b)** O outro tipo é uma enzima solúvel que contém heme e é ativada por óxido nítrico (NO) intracelular. Esta forma está presente em muitos tecidos, incluindo o músculo liso do coração e dos vasos sanguíneos.

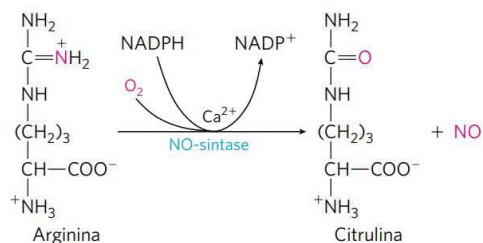
tão contidos em um único polipeptídeo ($M_r \sim 80.000$). Parte do domínio de regulação se encaixa firmemente na fenda de ligação ao substrato. A ligação de cGMP força a saída desse pseudosubstrato do sítio de ligação, abrindo o sítio para proteínas-alvo contendo a sequência-consenso da PKG.

O GMP cíclico transmite mensagens diferentes em tecidos diferentes. Nos rins e no intestino, ele leva a alterações no transporte de íons e à retenção de água; no músculo cardíaco (tipo de músculo liso), ele sinaliza relaxamento; no cérebro, ele pode estar envolvido no desenvolvimento e na função cerebral em adultos. A guanilato-ciclase renal é ativada pelo hormônio peptídico **fator natriurético atrial (ANF)**, do inglês, *atrial natriuretic factor*, liberado pelas células do átrio cardíaco quando o coração está estirado pelo aumento do volume sanguíneo. Transportado até os rins pelo sangue, o ANF ativa a guanilil-ciclase nas células dos ductos coletores (Figura 12-23a). O aumento resultante na [cGMP] desencadeia um aumento na excreção renal de Na^+ e, consequentemente, de água, movida pela variação na pressão osmótica. A perda de água reduz o volume sanguíneo, opondo-se ao estímulo que inicialmente causou a secreção de ANF. O músculo liso vascular também possui um receptor guanilil-ciclase para o ANF. Quando ligado a esse receptor, o ANF causa o relaxamento (vasodilatação) dos vasos sanguíneos, o que aumenta o fluxo de sanguíneo enquanto diminui a pressão sanguínea.

Um receptor guanilil-ciclase similar presente na membrana plasmática das células epiteliais que revestem o in-

testino é ativado pelo peptídeo **guanilina** (Figura 12-23a), que regula a secreção de Cl^- no intestino. Esse receptor também é o alvo de uma endotoxina proteica termoestável produzida por *Escherichia coli* e outras bactérias gram-negativas. O aumento na [cGMP] causado pela endotoxina eleva a secreção de Cl^- e, conseqüentemente, diminui a reabsorção de água pelo epitélio intestinal, causando diarreia.

Um tipo diferente de guanilato-ciclase é uma proteína citosólica fortemente associada a um grupo heme (Figura 12-23b), enzima ativada por óxido nítrico (NO, do inglês, *nitric oxide*). O óxido nítrico é produzido a partir de arginina pela enzima **NO-sintase** dependente de Ca^{2+} , presente em muitos tecidos de mamíferos, difundindo-se da célula de origem para células das proximidades.

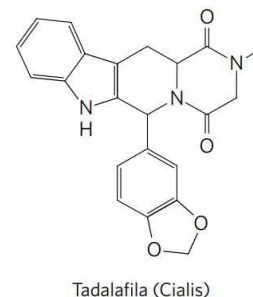
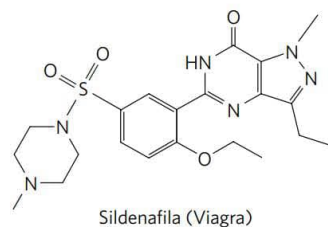


O NO é suficientemente apolar para atravessar as membranas plasmáticas sem um transportador. Na célula-alvo, ele se liga ao grupo heme da guanilato-ciclase e ativa a produção de cGMP. No coração, uma proteína-cinase dependente de cGMP reduz o vigor das contrações por meio do estímulo de bombas de íons que removem o Ca^{2+} do citosol.



O relaxamento do músculo cardíaco induzido por NO é uma resposta do mesmo tipo daquela provocada pela nitroglicerina e outros nitrovasodilatadores receitados para o alívio de **angina pectoris**, a dor causada pela contração de um coração com aporte insuficiente de O_2 devido ao bloqueio das artérias coronárias. O óxido nítrico é instável e sua ação é breve. Dentro de segundos após a formação, ele é oxidado a nitrito ou nitrato. Os nitrovasodilatadores produzem um relaxamento prolongado do músculo cardíaco porque são metabolizados ao longo de algumas horas, gerando uma liberação constante de NO. A utilidade da nitroglicerina para o tratamento de angina foi descoberta acidentalmente nas fábricas que produziam nitroglicerina para uso como explosivo na década de 1860. Os trabalhadores com angina relataram que os sintomas eram muito reduzidos durante a semana de trabalho e que aumentavam durante os finais de semana. Os médicos que tratavam esses pacientes ouviram essa história tantas vezes que fizeram a conexão, e assim deu-se o descobrimento de um medicamento.

Os efeitos da síntese de cGMP elevada diminuem quando o estímulo cessa, pois uma fosfodiesterase específica (cGMP-PDE) converte o cGMP ao inativo 5'-GMP. Os seres humanos têm diferentes isoformas da cGMP-PDE, com diferentes distribuições nos tecidos. A isoforma dos vasos sanguíneos do pênis é inibida pelos fármacos sildenafil (Viagra) e tadalafil (Cialis), que fazem a [cGMP] permanecer elevada uma vez que tenha sido aumentada por um estímulo apropriado, sendo a responsável pela utilidade desses fármacos no tratamento da disfunção erétil.



O GMP cíclico tem outro modo de ação nos olhos dos vertebrados. Ele provoca a abertura de canais iônicos específicos nos bastonetes e nos cones (discutido na Seção 12.3).

RESUMO 12.5 Receptores guanilato-ciclase, cGMP e proteína-cinase G

- Diversos sinais, incluindo o fator natriurético atrial e a guanilina, agem por meio de receptores enzimáticos com atividade de guanilato-ciclase. O cGMP produzido dessa maneira é um segundo mensageiro que ativa a proteína-cinase dependente de cGMP (PKG). Essa enzima altera o metabolismo por meio da fosforilação de enzimas-alvo específicas.
- O óxido nítrico é um mensageiro de vida curta que estimula uma guanilato-ciclase solúvel, elevando a [cGMP] e ativando a PKG.

12.6 Proteínas adaptadoras multivalentes e balsas lipídicas da membrana

Duas generalizações vieram à tona devido aos estudos sobre sistemas de sinalização, como aqueles discutidos até o momento: Primeiro, as proteínas-cinase que fosforilam e as fosfatases que desfosforilam resíduos de Tyr, Ser e Thr são centrais na sinalização, elas afetam *diretamente* a atividade de muitas proteínas substratos por fosforilação/desfosforilação. Segundo, interações proteína-proteína decorrentes da fosforilação reversível de resíduos de Tyr, Ser e Thr em proteínas sinalizadoras criam *sítios de encaixe* para outras proteínas que produzem efeitos *indiretos* em proteínas envolvidas em etapas posteriores da via de sinalização. Na verdade, muitas proteínas de sinalização são *multivalentes*, isto é, elas podem interagir com diversas proteínas diferentes de modo simultâneo para formar complexos de sinalização multiproteicos. Esta seção apresenta alguns exemplos que ilustram os princípios gerais das interações proteicas dependentes de fosforilação em rotas de sinalização.

Módulos proteicos se ligam aos resíduos de Tyr, Ser ou Thr das proteínas associadas

A proteína Grb2 da rota de sinalização da insulina (Figuras 12-19 e 12-22) liga-se por meio do domínio SH2 a outras proteínas que apresentem resíduos de Tyr expostos. O genoma humano codifica pelo menos 87 proteínas que contêm SH2, muitas já conhecidas por participarem da sinalização celular. O resíduo de tirosina fosforilada liga-se a uma fenda profunda do domínio SH2, com cada um dos oxigênios do fosfato participando de ligações de hidrogênio ou interações eletrostáticas, sendo as cargas positivas de dois resíduos de Arg muito importantes para a ligação. Diferenças sutis na estrutura dos domínios SH2 são responsáveis pela especificidade da interação das proteínas contendo SH2 com as várias proteínas que contêm tirosina fosforilada. O domínio SH2 geralmente interage com uma tirosina fosforilada (à qual é atribuída a posição 0) e com os próximos três resíduos em direção ao carboxiterminal (denominadas +1, +2, +3). Algumas proteínas com domínios (Src, Fyn, Hck, Nck) preferem resíduos carregados negativamente nas posições +1 e +2, ao passo que outras (PLC γ 1, SHP2) têm uma fenda hidrofóbica profunda que liga resíduos alifáticos nas posições de +1 a +5. Essas diferenças definem as diferentes especificidades das subclasses de domínios SH2 para se associarem com proteínas diferentes.

Domínios de ligação à tirosina fosforilada, ou **domínios PTB**, também interagem com proteínas com tirosina fosforilada (Figura 12-24), mas têm sequências fundamentais e estruturas tridimensionais que as diferenciam dos domínios SH2. O genoma humano codifica 24 proteínas que contêm domínios PTB, incluindo o IRS-1, cuja função como proteína adaptadora na transdução do sinal da insulina já foi comentada (Figura 12-19). Os sítios de ligação a tirosinas fosforiladas dos domínios SH2 e PTB nas proteínas às quais eles se associam são criados por tirosinas-quinase e eliminados por proteínas-tirosina-fosfatase/ fosfotirosinas-fosfatase (PTPases).

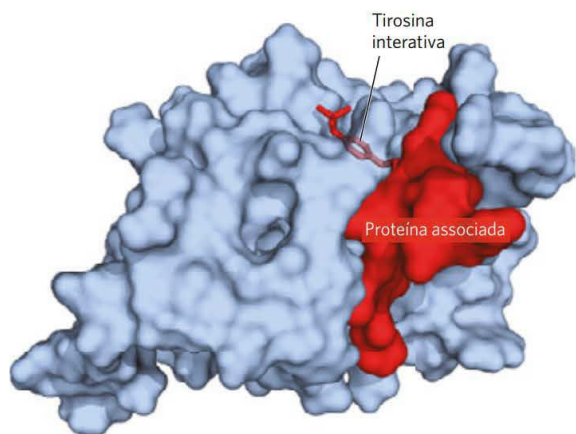


FIGURA 12-24 Interação de um domínio PTB com um resíduo de fosfotirosina de uma proteína associada. O domínio PTB está representado como uma superfície de contorno azul. A proteína associada fica mantida ligada à cinase por várias interações não covalentes, cada uma conferindo especificidade para a interação e para o posicionamento do resíduo fosfoserina em um bolsão de ligação no sítio ativo da enzima. [Fonte: PDB ID 1SHC, M. M. Zhou et al., *Nature* 378:584, 1995.]

Outras proteínas-quinase sinalizadoras, incluindo PKA, PKC, PKG e membros da cascata das MAPK, fosforilam resíduos de Ser ou Thr nas proteínas-alvo, as quais, em alguns casos, adquirem a capacidade de interagir com outras proteínas por meio do resíduo fosforilado, desencadeando todo um processo. Uma “sopa de letrinhas” de domínios que se ligam aos resíduos de serina e tirosina fosforiladas foi identificada e, certamente, outras ainda serão encontradas. Cada domínio tem uma sequência predominante ao redor dos resíduos fosforilados, de modo que as proteínas que tenham determinado domínio interagem com um subconjunto de proteínas fosforiladas.

Em alguns casos, a região de uma proteína que liga a tirosina fosforilada em uma proteína substrato é coberta pela região que interage com a tirosina fosforilada na mesma proteína. Por exemplo, a proteína solúvel tirosina-quinase Src torna-se inativa quando fosforilada em um resíduo de Tyr crucial. O domínio SH2 precisa ligar a proteína substrato, em vez de ligar a fosfotirosina interna. Quando esse resíduo de fosfotirosina é hidrolisado por uma fosfoproteína-fosfatase, a atividade tirosina-quinase da Src é ativada (Figura 12-25a).

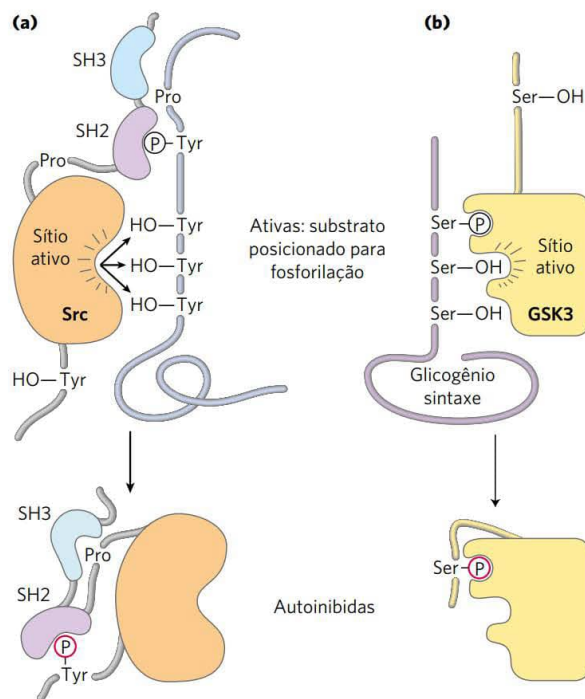


FIGURA 12-25 Mecanismo de autoinibição de Src e GSK3. (a) Na forma ativa da tirosina-quinase Src, um domínio SH2 liga-se a uma fosfotirosina do substrato proteico e um domínio SH3 liga-se a uma região do substrato rica em prolina, alinhando o sítio ativo da cinase com alguns resíduos-alvo de Tyr no substrato (parte superior). Quando a Src é fosforilada em um resíduo de Tyr específico (parte inferior), o domínio SH2 liga-se à fosfotirosina interna, em vez de se ligar à fosfotirosina do substrato, e o domínio SH3 liga-se a uma região interna rica em prolina, impedindo a efetiva ligação enzima-substrato; a enzima está, portanto, autoinibida. (b) Na forma ativa da glicogênio-sintase-3 (GSK3), um domínio interno de ligação à fosfoserina está disponível para se ligar à fosfoserina do substrato (a glicogênio-sintase) e, desse modo, posicionar a cinase para fosforilar os resíduos de Ser vizinhos (parte superior). A fosforilação do resíduo de Ser interno permite que um segmento interno da cinase ocupe o sítio de ligação à fosfoserina, bloqueando a ligação do substrato (parte inferior).

De modo similar, a glicogênio-sintase-cinase-3 (GSK3, do inglês, *glycogen synthase kinase 3*) está inativa quando fosforilada em um resíduo de Ser do domínio autoinibitório (Figura 12-25b). A desfosforilação desse domínio libera a enzima para se ligar (e depois fosforilar) às suas proteínas-alvo.

Além dos três resíduos comumente fosforilados nas proteínas, existe uma quarta estrutura a partir da qual se formam complexos supramoleculares de proteínas sinalizadoras: o grupo polar fosforilado dos fosfatidilinositóis da membrana. Muitas proteínas sinalizadoras contêm domínios como SH3 e PH (domínio homólogo à plestrina) que se ligam fortemente a PIP_3 que estejam protuberantes no lado citoplasmático da membrana plasmática. Onde quer que a enzima PI3K crie esse grupo (como o faz em resposta à sinalização por insulina), as proteínas que ligam PIP_3 se agrupam na superfície da membrana.

A maioria das proteínas envolvidas em sinalização na membrana plasmática tem um ou mais domínios de ligação a proteínas ou fosfolípidos; muitas têm três ou mais, sendo, portanto, multivalentes nas interações com outras proteínas sinalizadoras. A **Figura 12-26** mostra apenas algumas das proteínas multivalentes conhecidas por participarem da sinalização. Muitos dos complexos incluem componentes com

domínios de ligação à membrana. Considerando-se que tantos processos de sinalização se estabelecem na superfície interna da membrana plasmática, as moléculas que devem colidir para produzir a resposta sinalizadora ficam efetivamente confinadas a um espaço bidimensional – a superfície da membrana –, onde é muito mais provável haver colisões do que no espaço tridimensional do citosol.

Em resumo, um quadro extraordinário de vias de sinalização tem emergido a partir dos estudos de muitas proteínas sinalizadoras e de seus vários domínios de ligação. Um sinal inicial resulta na fosforilação do receptor ou de uma proteína-alvo, iniciando o agrupamento de grandes complexos multiproteicos, unidos sobre arcabouços capazes de fazer ligações multivalentes. Alguns desses complexos contêm diferentes proteínas-cinase que ativam umas às outras em sequência, produzindo uma cascata de fosforilações e uma grande amplificação do sinal inicial. As interações entre as cinases dessas cascatas não são deixadas ao acaso das colisões aleatórias no espaço tridimensional. Na cascata das MAPK, por exemplo, uma proteína de ancoragem, KSR, liga as três cinases (MAPK, MAPKK e MAPKKK), garantindo a proximidade e a orientação corretas e até mesmo conferindo propriedades alostéricas às interações entre as cinases,

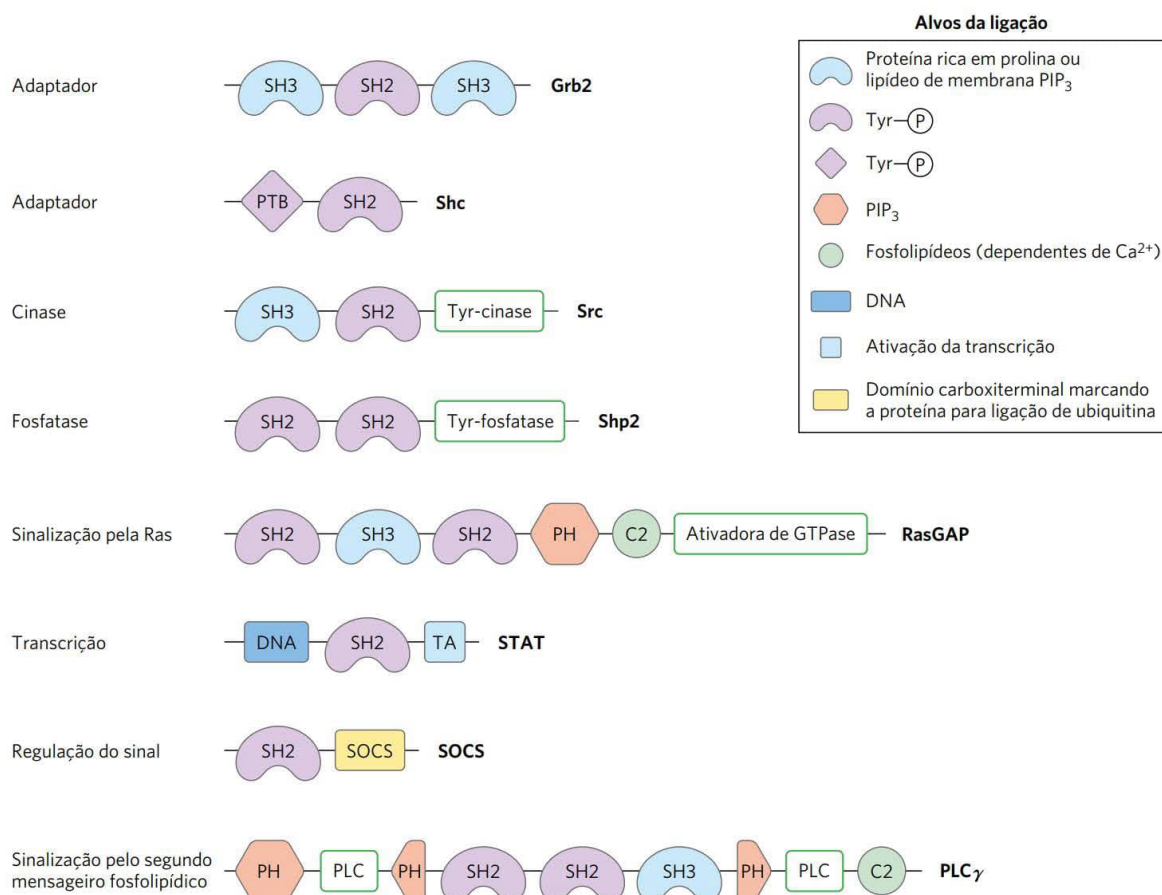


FIGURA 12-26 Alguns módulos de ligação de proteínas sinalizadoras. Cada proteína está representada por uma linha (com a extremidade aminoterminal à esquerda); os símbolos indicam a localização de domínios conservados (as especificidades estão listadas na legenda; abreviações estão explicadas no texto); os retângulos em verde indicam atividades catalíticas. O nome de cada proteína está indicado na extremidade carboxiterminal. Estas proteínas sinalizadoras interagem com proteínas fosforiladas ou fosfolípidos em diversos arranjos e combinações para formar complexos de sinalização integrados. [Fonte: informações de T. Pawson et al., *Trends Cell Biol.* 11:504, 2001, Fig. 5.]

o que torna essa série de fosforilações sensível a estímulos mínimos (**Figura 12-27**).

As fosfotirosinas-fosfatase removem o fosfato dos resíduos de fosfotirosina, revertendo o efeito da fosforilação. No genoma humano, existem ao menos 37 genes que codificam para proteínas-tyrosina-fosfatase (PTPs). Cerca de metade deles são proteínas integrais tipo receptores com um único domínio transmembrana. Supõe-se que elas sejam controladas por fatores extracelulares ainda não identificados. Outras PTPs são solúveis e contêm domínios SH2 que determinam quais são as proteínas com quem interagem dentro da célula. Além disso, as células animais possuem fosfatases de proteínas fosforiladas em Ser e Thr como PPI, que reverte os efeitos de serina-cinase e treonina-cinase. É possível

observar, assim, que a sinalização ocorre em **circuitos proteicos**, os quais efetivamente conectam o receptor do sinal ao efetor da resposta e podem ser desligados instantaneamente pela hidrólise de uma única ligação éster de fosfato em uma etapa anterior. Nesses circuitos, as proteínas-cinase são os escritores, os domínios tipo SH2 são os leitores e as PTPs e outras fosfatases são aqueles que apagam o que foi escrito.

A multivalência das proteínas sinalizadoras permite que elas se organizem em muitas combinações diferentes, como se as moléculas sinalizadoras fossem peças de Lego. Cada combinação é apropriada para sinais específicos, tipos de células e circunstâncias metabólicas, produzindo diversos circuitos sinalizadores extraordinariamente complexos.

Balsas e cavéolas da membrana segregam proteínas sinalizadoras

Balsas da membrana (Capítulo 11) são regiões da bicamada da membrana ricas em esfingolípídeos, esteróis e certas proteínas, incluindo muitas proteínas ligadas à membrana por derivados glicosilados ancorados por fosfatidilinositol (GPI, do inglês, *glycosylated derivatives of phosphatidylinositol*). O receptor β -adrenérgico é segregado em balsas que também possuem proteínas G, adenilil-ciclase, PKA e a proteína PP2 fosfatase que, em conjunto, propiciam uma unidade sinalizadora altamente integrada. Pela segregação em uma pequena região da membrana plasmática com todos os elementos necessários para responder a um sinal e para extingui-lo, a célula é capaz de produzir uma “lufada” de segundo mensageiro extremamente curta e localizada.

Algumas RTKs (EGFR e PDGFR) também estão localizadas nas balsas, o que, possivelmente, tem significância funcional. Em fibroblastos isolados, EGFR geralmente está concentrada em balsas especializadas, denominadas cavéolas (ver Figura 11-20). Quando as células são tratadas com EGF, o receptor sai da balsa e fica separado dos outros componentes da via de sinalização do EGF. Essa migração é dependente da atividade da proteína-cinase do receptor. Os receptores mutantes que não possuem essa atividade permanecem na balsa durante o tratamento com EGF. Experimentos desse tipo sugerem que a separação espacial de proteínas sinalizadoras em balsas é mais uma dimensão do já complexo processo iniciado por sinais extracelulares.

RESUMO 12.6 Proteínas adaptadoras multivalentes e balsas lipídicas da membrana

- Muitas proteínas sinalizadoras apresentam domínios que se ligam aos resíduos de Tyr, Ser ou Thr fosforilados de outras proteínas. A especificidade de ligação para cada domínio é determinada pelas sequências adjacentes ao resíduo fosforilado da proteína substrato.
- Os domínios SH2 e PTB ligam-se a proteínas que contenham resíduos de fosfotirosina. Outros domínios se ligam aos resíduos de fosfoserina e fosfotreonina em contextos diferentes.
- Os domínios SH3 e PH ligam-se ao fosfolípídeo de membrana PIP₃.

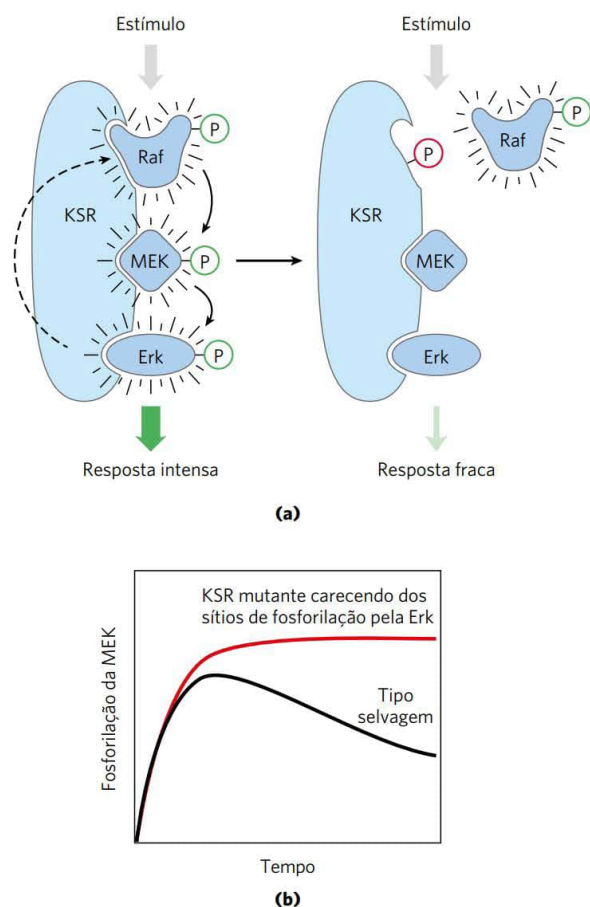


FIGURA 12-27 Uma proteína do esqueleto de levedura que organiza e regula uma cascata de proteínas-cinase. **(a)** A proteína KSR, do esqueleto da célula, tem sítios de ligação para cada uma das três cinases da cascata a Raf/MEK/Erk. Com todas as três ligadas em orientações apropriadas, as interações entre as proteínas são rápidas e eficientes. Quando a Erk é ativada (à esquerda), ela fosforila o sítio de ligação da Raf (à direita), forçando uma mudança conformacional que desloca a Raf e, portanto, impede a fosforilação da MEK. O resultado desta regulação por retroalimentação é a fosforilação temporária da MEK. **(b)** Nas células de leveduras que tenham uma KSR mutante na qual os sítios de fosforilação (curva em vermelho) estejam ausentes não ocorre retroalimentação, e o curso dos eventos de sinalização ao longo do tempo é diferente. [Fonte: informações de M. C. Good et al., *Science* 332:680, 2011, Fig. 2E.]

- Muitas proteínas de sinalização são multivalentes, com diversos módulos de ligação diferentes. As células criam muitos complexos de sinalização multiproteicos por meio da combinação das especificidades de substratos das várias proteínas-cinase com as especificidades de domínios que se ligam a resíduos de Ser, Thr ou Tyr fosforilados e com fosfatases que podem inativar rapidamente uma via de sinalização.
- Balsas e cavéolas da membrana sequestram grupos de proteínas sinalizadoras em pequenas regiões da membrana plasmática, aumentando, assim, a concentração local dessas proteínas, tornando o sinal mais eficiente.

12.7 Canais iônicos controlados por portões

Canais iônicos são a base da sinalização elétrica nas células excitáveis

Certas células dos organismos multicelulares são “excitáveis”. Elas podem detectar um sinal externo, convertê-lo em um sinal elétrico (especificamente, uma alteração do potencial da membrana) e passá-lo adiante. As células excitáveis desempenham papéis essenciais na condução nervosa, na contração muscular, na secreção hormonal, nos processos sensoriais, no aprendizado e na memória. A excitabilidade de células sensoriais, de neurônios e de miócitos depende de canais iônicos, transdutores de sinal que fornecem uma via regulada para o movimento de íons inorgânicos (como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Cl^-) através da membrana plasmática em resposta a vários estímulos. Lembre-se, do Capítulo 11, de que esses canais iônicos são controlados por “portões”: podem estar abertos ou fechados, dependendo de se o receptor associado estiver ativado pela interação com seu ligante específico (p. ex., um neurotransmissor) ou por uma variação no potencial elétrico transmembrana, V_m . A Na^+/K^+ -ATPase é eletrogênica, ela cria um desbalanço de cargas através da membrana plasmática por carrear 3 Na^+ para fora da célula para cada 2 K^+ que traz para dentro (Figura 12-28a). A ação da ATPase torna o interior da célula negativo em relação ao exterior. Dentro da célula, a $[\text{K}^+]$ é muito maior e a $[\text{Na}^+]$ é muito menor do que fora da célula (Figura 12-28b). A direção do fluxo espontâneo de íons através da membrana polarizada é ditada pelo potencial eletroquímico de determinado íon através da membrana, o qual tem dois componentes: a diferença de concentração do íon entre os dois lados da membrana e a diferença no potencial elétrico (V_m), geralmente expresso em milivolts (ver Equação 11-4, p. 413). Considerando as diferenças entre as concentrações do íon e que o V_m é de cerca de -60 mV (negativo no interior), a abertura de canais Na^+ ou de Ca^{2+} leva a um fluxo espontâneo Na^+ ou Ca^{2+} para dentro da célula (e despolarização), ao passo que a abertura de canais de K^+ leva a um fluxo espontâneo de K^+ para fora da célula (e hiperpolarização) (Figura 12-28b). Nesse caso, K^+ sai da célula contra o gradiente eletroquímico porque a grande diferença entre as concentrações dentro e fora da célula exerce um efeito muito mais forte do que V_m . Para o Cl^- , o potencial de membrana predomina, de modo que quando um canal de Cl^- abre, Cl^- sai da célula.

O número de íons que devem fluir para produzir uma variação fisiologicamente significativa no potencial de membrana é ínfimo em relação às concentrações de Na^+ , K^+ e

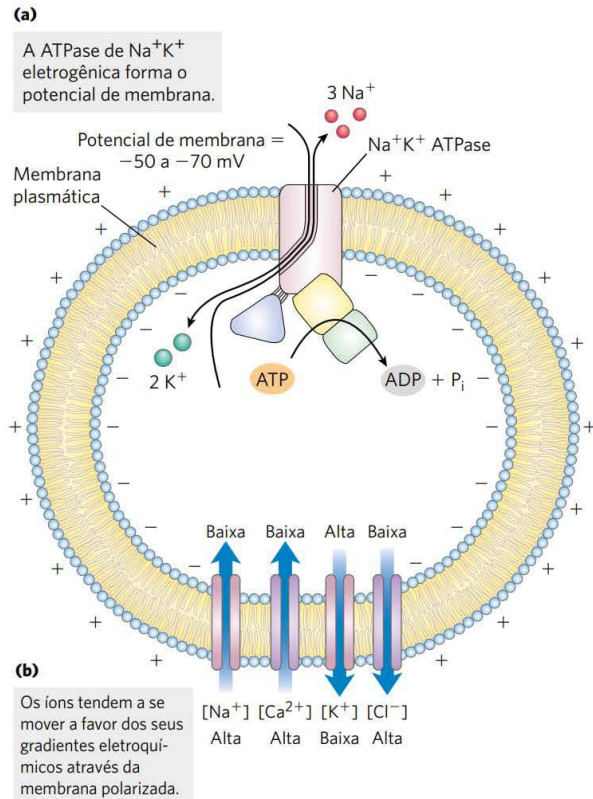


FIGURA 12-28 Potencial elétrico transmembrana. (a) A Na^+/K^+ -ATPase é eletrogênica e produz um potencial elétrico transmembrana de cerca de -60 mV (negativo no interior). (b) As setas azuis indicam a direção na qual os íons tendem a se mover espontaneamente através da membrana plasmática de uma célula animal, impelidos por uma combinação de gradientes químicos e elétricos. O gradiente químico impele íons Na^+ e Ca^{2+} para dentro da célula (produzindo despolarização) e o íon K^+ para fora, contra o seu gradiente elétrico (produzindo hiperpolarização). O gradiente elétrico impele Cl^- para fora, contra a concentração do gradiente (produzindo despolarização).

Cl^- nas células e no líquido extracelular, de modo que os fluxos iônicos que ocorrem durante a sinalização em células excitáveis essencialmente não têm efeito algum sobre as concentrações desses íons. Com o íon Ca^{2+} a situação é diferente, uma vez que a concentração intracelular de Ca^{2+} geralmente é muito pequena ($\sim 10^{-7}$ M) e o fluxo de Ca^{2+} para dentro da célula pode alterar significativamente a concentração citosólica de Ca^{2+} , possibilitando que ele sirva como segundo mensageiro.

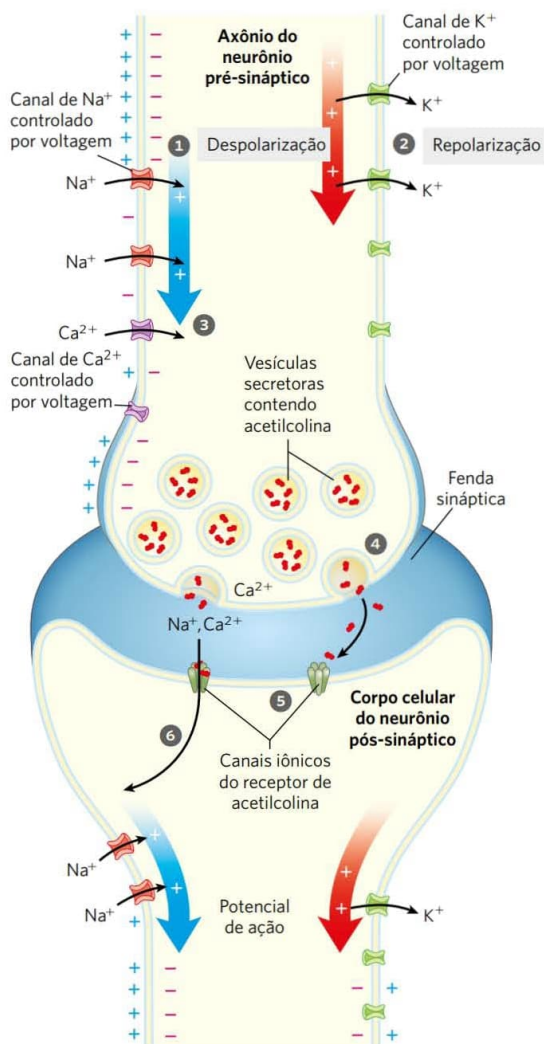
O potencial de membrana de uma célula em um dado momento é a consequência dos tipos e números de canais iônicos abertos naquele momento. O tempo preciso de abertura e fechamento de canais iônicos e as variações transitórias resultantes no potencial de membrana são a base da sinalização elétrica por meio da qual o sistema nervoso estimula o músculo esquelético a contrair, o coração a bater ou as glândulas secretoras a liberarem seus conteúdos. Além disso, muitos hormônios exercem os seus efeitos pela alteração do potencial de membrana das células-alvo. Esses mecanismos não estão limitados às células animais; os canais

iônicos desempenham funções importantes nas respostas de bactérias, protistas e plantas a sinais do ambiente.

Para ilustrar a ação dos canais iônicos na sinalização célula a célula, serão descritos os mecanismos pelos quais um neurônio passa adiante um sinal ao longo de todo o seu comprimento e atravessa uma sinapse até o próximo neurônio (ou até um miócito) em um circuito celular, utilizando a acetilcolina como neurotransmissor.

Canais iônicos dependentes de voltagem produzem os potenciais de ação dos neurônios

A sinalização no sistema nervoso é efetuada por redes de neurônios, células especializadas que transferem um impulso elétrico (potencial de ação) a partir de uma extremidade da célula (o corpo celular) ao longo de uma extensão citoplasmática alongada (o axônio). O sinal elétrico desencadeia a liberação de moléculas de neurotransmissores na sinapse, transferindo o sinal para a próxima célula no circuito. Três tipos de **canais iônicos dependentes de voltagem** são essenciais a esse mecanismo de sinalização. Ao longo de todo o comprimento do axônio estão **canais de Na^+ dependentes de voltagem** (Figura 12-29), que permanecem fechados



quando a membrana está em repouso ($V_m = -60 \text{ mV}$), mas se abrem brevemente quando a membrana é despolarizada localmente em resposta à acetilcolina (ou algum outro neurotransmissor). **Canais de K^+ dependentes de voltagem** também estão distribuídos ao longo do axônio. Esses canais se abrem uma fração de segundo atrasados em resposta à despolarização que acontece quando canais de Na^+ que estejam próximos se abrem. O fluxo despolarizante de Na^+ no axônio (influxo) é então rapidamente contrabalançado pelo fluxo repolarizante de K^+ para fora da célula (efluxo). Na extremidade distal do axônio estão **canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem**, que se abrem quando chega a onda de despolarização (etapa 1) e repolarização (etapa 2) causada pelas atividades dos canais de Na^+ e K^+ , desencadeando a liberação do neurotransmissor acetilcolina, que transmite o sinal para outro neurônio (dispara um potencial de ação) ou para uma fibra muscular (contração).

Os canais de Na^+ dependentes de voltagem são seletivos para Na^+ em relação a outros cátions por um fator de 100 ou mais. Eles também têm uma grande velocidade de fluxo, de $> 10^7$ íons/s. Um canal de Na^+ que abre em resposta à redução no potencial elétrico transmembrana fecha em cerca de milissegundos e permanece incapaz de reabrir por muitos milissegundos. O influxo de Na^+ através de canais de Na^+ abertos despolariza a membrana localmente, o que leva à abertura dos canais de K^+ (Figura 12-29, etapa 1). O efluxo de K^+ resultante repolariza a membrana localmente, e o potencial com o potencial de membrana com o lado interno negativo é restabelecido (etapa 2). A estrutura e o mecanismo dos canais de K^+ dependentes de voltagem foram discutidos com

FIGURA 12-29 Função dos canais iônicos dependentes de voltagem e dependentes de ligante na transmissão nervosa. Inicialmente, a membrana plasmática do neurônio pré-sináptico é polarizada (o lado interno fica negativo) por meio da ação da Na^+/K^+ -ATPase eletrogênica, que bombeia 3 Na^+ para cada 2 K^+ bombeados para dentro (ver Figura 12-28). 1 A estimulação desse neurônio (não mostrado) causa o avanço de um potencial de ação ao longo do axônio (setas azuis), que se distancia do corpo celular. A abertura de um canal de Na^+ dependente de voltagem faz Na^+ entrar na célula, a despolarização local resultante faz canais de Na^+ vizinhos abrirem, e assim por diante. A direcionalidade do movimento do potencial de ação é garantida pelo breve período refratário subsequente à abertura de cada canal de Na^+ dependente de voltagem. 2 Uma fração de segundo depois que o potencial de ação passa em um ponto do axônio, há a abertura de canais de K^+ dependentes de voltagem e isso permite a saída de K^+ , que leva à repolarização da membrana (flecha vermelha), que, então, está pronta para um novo potencial de ação. (Observe que, para maior clareza, os canais de Na^+ e de K^+ estão desenhados em lados opostos do axônio, embora os dois tipos estejam distribuídos uniformemente na membrana do axônio. Do mesmo modo, as cargas positivas e negativas estão mostradas apenas no lado esquerdo, porém, à medida que o potencial corre pelo axônio, o potencial de membrana é o mesmo em cada segmento ao longo do axônio.) 3 Quando a onda de despolarização atinge a extremidade do axônio, os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem abrem-se, permitindo a entrada de Ca^{2+} . 4 O aumento na $[\text{Ca}^{2+}]$ no interior da célula resultante dispara a liberação, por exocitose, do neurotransmissor acetilcolina na fenda sináptica. 5 A acetilcolina liga-se a um receptor no neurônio (ou miócito) pós-sináptico, levando à abertura de seu canal iônico dependente de ligante. 6 Na^+ e Ca^{2+} do lado externo da célula entram através desse canal, despolarizando a célula pós-sináptica. O sinal elétrico, desse modo, foi transferido para o corpo celular do neurônio (ou miócito) pós-sináptico e irá se deslocar ao longo do axônio até um terceiro neurônio (ou miócito) por meio dessa mesma sequência de eventos.

algum detalhe na Seção 11.3 (ver Figuras 11-45 e 11-46). Um pulso curto de despolarização, portanto, viaja pelo axônio conforme a despolarização localizada desencadeia a breve abertura dos canais de Na^+ e, posteriormente, dos canais de K^+ vizinhos. O curto período refratário que se segue à abertura de cada canal de Na^+ , durante o qual ele não pode se abrir novamente, assegura que uma onda de despolarização unidirecional – o potencial de ação – percorra a célula nervosa, a partir do corpo celular e em direção à ponta do axônio.

Quando a onda de despolarização atinge os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, eles se abrem (etapa 3), e o Ca^{2+} entra a partir do espaço extracelular. O aumento na $[\text{Ca}^{2+}]$ citoplasmática, então, provoca a liberação de acetilcolina para dentro da fenda sináptica por exocitose (etapa 4). A acetilcolina difunde-se para a célula pós-sináptica (outro neurônio ou um miócito), onde se liga a receptores de acetilcolina e dispara uma despolarização (descrito a seguir). Dessa maneira, a mensagem é transmitida à próxima célula do circuito. Observa-se, portanto, que os canais iônicos dependentes transmitem os sinais elétricos de duas maneiras: pela variação da concentração citoplasmática de um íon (como o Ca^{2+}), que, então, atua como segundo mensageiro intracelular, ou pela variação do V_m , que altera outras proteínas da membrana sensíveis a ele. A passagem de um sinal elétrico por um neurônio, e deste para outro neurônio, ilustra os dois tipos de mecanismo.

Os neurônios têm canais receptores que respondem a diferentes neurotransmissores

As células animais, sobretudo aquelas do sistema nervoso, contêm uma grande variedade de canais iônicos dependentes de ligante, voltagem ou ambos. Os receptores que são eles mesmos canais iônicos são classificados como **ionotrópicos**, para distingui-los dos receptores que geram um segundo mensageiro (receptores **metabotrópicos**). A acetilcolina age sobre um receptor ionotrópico na célula pós-sináptica. O receptor de acetilcolina é um canal iônico. Quando ligado com acetilcolina, o receptor abre a passagem de cátions (Na^+ , K^+ e Ca^{2+}), disparando a despolarização da célula. Os neurotransmissores serotonina, glutamato e glicina agem por meio de receptores ionotrópicos, que possuem estruturas parecidas com a estrutura do receptor de acetilcolina. Serotonina e glutamato disparam a abertura de canais de cátions (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}), ao passo que a glicina abre canais específicos para Cl^- .

Dependendo do íon que passa pelo canal, a interação com o ligante (neurotransmissor) daquele canal resulta na despolarização ou na hiperpolarização da célula-alvo. Um único neurônio normalmente recebe sinais de muitos outros neurônios, cada qual liberando seu próprio neurotransmissor característico, com o efeito despolarizante ou hiperpolarizante característico. O V_m da célula-alvo, portanto, reflete a **integração** (Figura 12-1e) dos sinais recebidos de muitos neurônios. A célula responde com um potencial de ação apenas se a soma dessa integração de sinais levar a uma despolarização suficientemente grande.

Os canais receptores de acetilcolina, glicina, glutamato e ácido-aminobutírico (GABA) são dependentes de ligantes *extracelulares*. Os segundos mensageiros *intracelulares*, como cAMP, cGMP, IP_3 , Ca^{2+} e ATP, regulam canais iônicos do tipo visto na transdução dos sinais das sensações da visão, olfação e gustação.

Toxinas que têm canais iônicos como alvos

Muitas das toxinas mais potentes da natureza atuam sobre canais iônicos. Por exemplo, a dendrotoxina (da serpente mamba-negra) bloqueia a ação dos canais de K^+ dependentes de voltagem, a tetrodotoxina (produzida pelo baiacu) age sobre os canais de Na^+ dependentes de voltagem e a cobrotoxina desativa os canais iônicos receptores de acetilcolina. Por que, no curso da evolução, os canais iônicos tornaram-se o alvo preferencial de toxinas, em vez de algum alvo metabólico essencial, como enzimas cruciais para o metabolismo energético?

Os canais iônicos são amplificadores excepcionais. A abertura de um único canal pode permitir o fluxo de 10 milhões de íons por segundo. Em consequência, relativamente poucas moléculas de uma proteína de canal iônico são necessárias por neurônio para as funções de sinalização. Ou seja, um número relativamente pequeno de moléculas de toxina com alta afinidade por canais iônicos, agindo do exterior celular, pode ter um efeito muito pronunciado sobre a neurosinalização do organismo inteiro. Um efeito comparável via uma enzima metabólica, geralmente presente nas células em concentrações muito maiores do que os canais iônicos, exigiria um número muito maior de moléculas da toxina.

RESUMO 12.7 Canais iônicos controlados por portões

- Canais iônicos controlados pelo potencial de membrana ou por ligantes são fundamentais para a sinalização em neurônios e outras células.
- Os canais de Na^+ e K^+ dependentes de voltagem das membranas neuronais conduzem o potencial de ação ao longo do axônio na forma de uma onda de despolarização (entrada de Na^+) seguida pela repolarização (saída de K^+).
- A chegada de um potencial de ação à extremidade distal de um neurônio pré-sináptico desencadeia a liberação de neurotransmissores. O neurotransmissor (p. ex., acetilcolina) difunde-se até o neurônio pós-sináptico (ou miócito, na placa motora), liga-se a receptores específicos na membrana plasmática e provoca uma variação no V_m .
- As neurotoxinas produzidas por muitos organismos atacam canais iônicos, e, assim, têm ação rápida e letal.

12.8 Regulação da transcrição por receptores nucleares de hormônios

Os hormônios esteroides, o ácido retinoico (retinoide) e os hormônios da tireoide formam um grande grupo de hormônios (ligantes de receptores) que exercem pelo menos parte de seus efeitos por meio de um mecanismo fundamentalmente diferente daquele de outros hormônios: eles atuam no núcleo e alteram a expressão gênica. Esse modo de ação será detalhado no Capítulo 28, juntamente com outros mecanismos para a regulação da expressão gênica. Aqui será apresentada uma concisa visão geral.

Os hormônios esteroides (p. ex., estrogênio, progesterona e cortisol), excessivamente hidrofóbicos para se dissolverem no sangue, são transportados do ponto de liberação até os tecidos-alvo por proteínas transportadoras específicas. Esses hormônios, nas células-alvo, passam através da

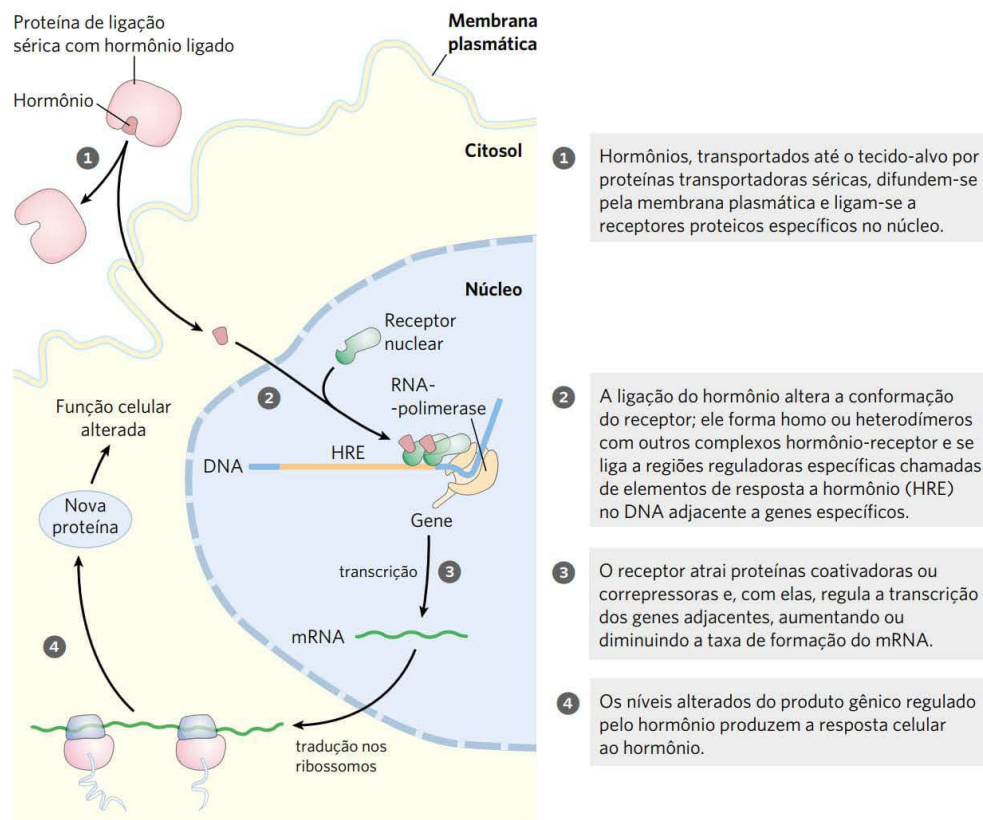


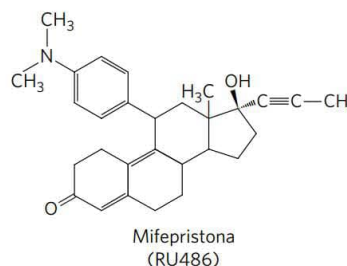
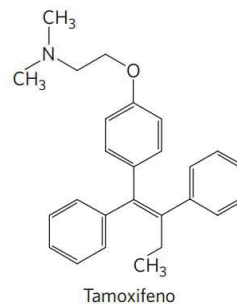
FIGURA 12-30 Mecanismo geral por meio do qual os hormônios esteroides e da tireoide, retinoides e vitamina D regulam a expressão gênica. Os detalhes da transcrição e da síntese proteica estão descritos nos Capítulos 26 e 27. Alguns esteroides também agem por meio de receptores presentes na membrana plasmática, mas por um mecanismo completamente diferente.

membrana plasmática e da membrana nuclear por difusão simples e se ligam a proteínas nucleares que são receptores específicos para esses hormônios (**Figura 12-30**). A ligação do hormônio induz alterações na conformação do receptor proteico, de modo que ele se torna capaz de interagir com sequências reguladoras específicas no DNA, chamadas de **elementos de resposta a hormônio (HRE)**, do inglês, *hormone response elements*, e, assim, alterar a expressão gênica (ver Figura 28-33). O complexo receptor-hormônio acoplado intensifica a expressão de genes específicos adjacentes aos HRE, com o auxílio de diversas outras proteínas essenciais à transcrição. Horas ou dias são necessários para que esses reguladores exerçam completamente seus efeitos – o tempo necessário para que as alterações na síntese de RNA e na posterior síntese de proteínas tornem-se evidentes no metabolismo alterado.



A especificidade entre a interação esteroide e receptor é usada no tratamento de câncer de mama pelo uso do fármaco **tamoxifeno**. Em alguns tipos de câncer de mama, a divisão das células cancerosas depende da presença contínua de estrogênio. O tamoxifeno é um antagonista do estrogênio. Ele compete com o estrogênio pela ligação ao receptor de estrogênio, porém o complexo tamoxifeno-receptor possui pouco, ou nenhum, efeito sobre a expressão gênica. Como consequência, a administração de tamoxifeno após cirurgia ou durante quimioterapia desacelera ou para o crescimento das células cancerosas remanes-

centes nos casos de câncer de mama dependentes do hormônio. Outro análogo de esteroide, o fármaco **mifepristona (RU486)**, liga-se ao receptor de progesterona e bloqueia a ação desse hormônio, essencial para a implantação do óvulo fecundado no útero, e, assim, age como contraceptivo.



RESUMO 12.8 Regulação da transcrição por receptores nucleares de hormônios

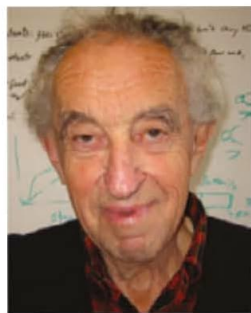
- Os hormônios esteroides entram nas células por difusão simples e ligam-se a receptores proteicos.
- O complexo hormônio-receptor liga-se a regiões específicas do DNA, os elementos de resposta a hormônio, e interage com outras proteínas para regular a expressão dos genes próximos.

12.9 Sinalização em microrganismos e plantas

Muito do que se mencionou até agora sobre sinalização é pertinente aos tecidos de mamíferos, ou às células de tecidos de mamíferos mantidas em cultura isoladas. Bactérias, arqueobactérias, microrganismos eucarióticos e plantas vasculares também devem responder a uma variedade de sinais externos, como O_2 , nutrientes, luz, substâncias químicas nocivas, e assim por diante. Agora, será feito um breve exame dos tipos de maquinaria de sinalização utilizados por microrganismos e plantas.

A sinalização bacteriana requer fosforilação em um sistema binário

Estudos pioneiros realizados por Julius Adler sobre a quimiotaxia em bactérias mostraram que *E. coli* responde aos nutrientes do ambiente, incluindo açúcares e aminoácidos, nadando em direção aos nutrientes impulsionadas pelo flagelo. Uma família de proteínas de membrana possui domínios de ligação na face externa da membrana plasmática, aos quais **atraentes** específicos (açúcares ou aminoácidos) se ligam (**Figura 12-31**). O sinal é transmitido por um **sistema binário**. O primeiro componente é um **receptor histidina-cinase**, que, em resposta à ligação do ligante, fosforila um resíduo de His em seu próprio



Julius Adler
[Fonte: cortesia de Hildegard Wohl Adler.]

domínio citoplasmático, e então catalisa a transferência do grupo fosforila do resíduo de His para um resíduo de Asp do segundo componente, uma proteína solúvel denominada **regulador da resposta**. Essa fosfoproteína se move até a base do flagelo, transferindo o sinal recebido pelo receptor da membrana. O flagelo é impulsionado por um motor giratório que pode impulsionar a célula através do meio ou para-lá, dependendo da direção da rotação do motor. As mudanças na concentração do atraente que ocorrem com o tempo, sinalizadas por meio do receptor, permitem que a célula determine o movimento para se aproximar ou se afastar do atraente. Se o movimento estiver em direção ao atraente, o regulador da resposta sinaliza à célula para continuar em linha reta (corrida). Caso estiver afastando-se, a célula tropeça momentaneamente e adota uma nova direção. A repetição desse comportamento resulta em uma rota aleatória, influenciada pelo movimento em direção à concentração aumentada do atraente.

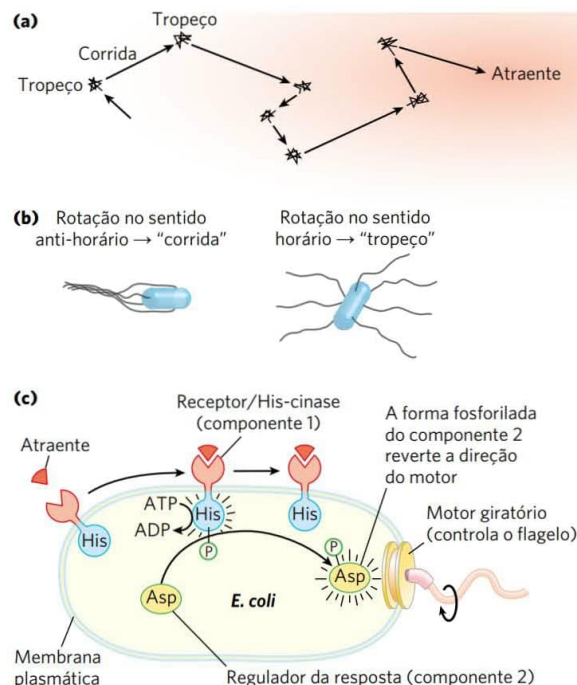


FIGURA 12-31 O mecanismo de sinalização binário na quimiotaxia bacteriana. (a) Quando colocada próxima a uma fonte de um soluto atraente, *E. coli* move-se de forma errática, tendendo na direção do atraente. (b) Os flagelos têm estruturas helicoidais intrínsecas, e, quando todos os flagelos giram no sentido anti-horário, suas hélices torcem-se juntas e movem-se coordenadamente, propulso a célula à frente, em uma "corrida". Quando os flagelos giram no sentido horário, os feixes de flagelos separam-se, e a célula escorrega momentaneamente, até que a rotação no sentido anti-horário recomeça e a célula volte a nadar para a frente, em uma nova direção aleatória. Quando a célula está se movendo na direção do atraente, ela apresenta menos "tropeços", e, portanto, corridas mais longas; quando ela está se afastando, os frequentes tropeços fazem o movimento ser efetivamente na direção do atraente. (c) A rotação dos flagelos é controlada por um sistema binário constituído por um receptor histidina-cinase e uma proteína efetora. Quando um ligante atraente se liga ao domínio receptor do receptor ligado à membrana, uma proteína His-cinase no domínio citosólico (componente 1) é ativada e autofosforila um resíduo de His. Esse grupo fosforila é, então, transferido para um resíduo de Asp do regulador da resposta (componente 2). Após a fosforilação, o regulador da resposta move-se para a base do flagelo, onde provoca uma rotação anti-horária, produzindo o movimento.

E. coli não detecta somente açúcares e aminoácidos, mas também O_2 , extremos de temperatura e outros fatores ambientais utilizando esse sistema binário básico. Os sistemas binários foram encontrados em muitas outras bactérias, gram-positivas e gram-negativas, e em arqueobactérias, assim como em protistas e fungos. Esse mecanismo de sinalização, evidentemente, desenvolveu-se cedo no curso da evolução celular e tem se mantido.

Vários sistemas de sinalização utilizados por células animais também têm análogos em bactérias. À medida que sequências completas dos genomas de um maior número de bactérias diferentes são conhecidas, pesquisadores descobrem genes que codificam para proteínas similares às proteínas Ser-cinase ou Tyr-cinase, proteínas semelhantes à Ras, reguladas pela ligação de GTP, e proteínas com domínios SH3. Os receptores Tyr-cinase ainda não foram

encontrados em bactérias, mas resíduos de fosfotirosina realmente ocorrem em algumas bactérias.

Os sistemas de sinalização de plantas têm alguns dos mesmos componentes utilizados por micróbios e mamíferos

Como os animais, as plantas vasculares devem ter um meio de comunicação entre os diversos tecidos para coordenar e dirigir o crescimento e o desenvolvimento, adaptarem-se às condições de O_2 , nutrientes, temperatura e disponibilidade de água e para alertar sobre a presença de agentes químicos nocivos e de patógenos. Pelo menos um bilhão de anos de evolução se passaram desde que os ramos dos organismos eucariotos de plantas e animais divergiram. Isso se reflete nas diferenças em mecanismos de sinalização: alguns dos mecanismos encontrados em vegetais são conservados – isto é, são similares àqueles dos animais (proteínas-cinase, proteínas adaptadoras, nucleotídeos cíclicos, bombas iônicas eletrogênicas e canais controlados por portões); alguns são similares aos sistemas binários das bactérias; e alguns são exclusivos das plantas (p. ex., mecanismos sensíveis à luz que refletem as mudanças sazonais no ângulo e, portanto, da cor da luz solar). O genoma da planta *Arabidopsis thaliana* codifica para cerca de 1.000 proteínas serinas-cinase e tirosinas-cinase, incluindo 60 MAPKs e quase 400 receptores-cinase associados à membrana que fosforilam resíduos de Ser ou Thr, diversas proteínas-fosfatase, enzimas da síntese e degradação de nucleotídeos cíclicos e 100 ou mais canais iônicos, sendo que 20 são controlados por nucleotídeos cíclicos. Estão presentes fosfolípidos de inositol e cinases que os interconvertem por meio da fosforilação dos grupos inositol. Mesmo considerando que *Arabidopsis* possui várias cópias de muitos genes, a presença de tantos genes relacionados à sinalização certamente reflete um amplo potencial de sinalização.

Entretanto, alguns tipos de proteínas de sinalização comuns aos tecidos animais não estão presentes em plantas, ou estão representados por apenas poucos genes. Por exemplo, proteínas-cinase ativadas por nucleotídeos cíclicos (PKA e PKG) parecem estar ausentes. Genes de proteínas G heterodiméricas e de tirosinas-cinase são muito menos proeminentes no genoma de plantas e o modo de ação dessas proteínas é diferente daqueles das células animais. GPCR, a maior família de proteínas sinalizadoras presente no genoma humano, não está presente nos genomas de plantas. Os receptores nucleares para esteroides que se ligam ao DNA certamente não são abundantes e muitos podem estar ausentes em plantas. Embora as plantas não possuam o mecanismo sensível à luz mais amplamente conservado presente nos animais (a rodopsina, que utiliza o retinal como pigmento), elas apresentam um rico conjunto de outros mecanismos para a detecção da luz, não encontrados nos tecidos animais, como, por exemplo, fitocromos e criptocromos (Capítulo 20).

RESUMO 12.9 Sinalização em microrganismos e plantas

- As bactérias e os microrganismos eucarióticos têm diversos sistemas sensoriais que os permitem testar e responder ao ambiente. No sistema binário, um receptor histidina-cinase reconhece o sinal e autofosforila um re-

síduo de His, fosforilando, então, um resíduo de Asp no regulador da resposta.

- As plantas respondem a muitos estímulos ambientais e fazem uso de hormônios e fatores de crescimento para coordenar o desenvolvimento e as atividades metabólicas de seus tecidos. Os genomas vegetais codificam centenas de proteínas de sinalização, incluindo algumas muito similares às de mamíferos.
- Plantas não possuem GPCRs ou proteínas-cinase ativadas por cAMP ou cGMP.

12.10 Regulação do ciclo celular por proteínas-cinase

Uma das manifestações mais evidentes das rotas de sinalização é a regulação do ciclo celular dos organismos eucarióticos. Durante o crescimento embrionário e o desenvolvimento posterior, a divisão celular ocorre em praticamente todos os tecidos. Nos organismos adultos, a maioria dos tecidos torna-se quiescente. A “decisão” de uma célula entre dividir-se ou não é de grande importância para o organismo. Quando os mecanismos de regulação que limitam a divisão celular estão defeituosos e as células se dividem desordenadamente, o resultado é catastrófico: câncer. A divisão celular correta requer uma sequência organizada de eventos bioquímicos que assegurem a cada célula-filha o conjunto completo das moléculas necessárias para a vida. As investigações sobre o controle da divisão celular em diversas células eucarióticas têm revelado mecanismos de regulação universais. Mecanismos de sinalização, muito semelhantes àqueles discutidos anteriormente, são fundamentais para determinar se e quando uma célula passa pela divisão celular, garantindo também a passagem ordenada pelos estágios do ciclo celular.

O ciclo celular tem quatro estágios

A divisão celular que segue a mitose em eucariotos ocorre em quatro etapas bem definidas (**Figura 12-32**). Na fase S (síntese), o DNA é replicado para gerar as cópias para ambas as células-filhas. Na fase G2 (*G* indica o intervalo entre divisões; do inglês, *gap*), novas proteínas são sintetizadas e a célula praticamente dobra de tamanho. Na fase M (mitose), o envelope nuclear materno se desfaz, os cromossomos pareados são puxados para os polos opostos da célula, cada conjunto de cromossomos é circundado por um envelope nuclear recém-formado e a citocinese estrangula a célula pela metade, originando duas células-filhas (ver Figura 24-23). Nos tecidos embrionários ou naqueles que proliferam rapidamente, cada célula-filha se divide novamente, mas somente após um período de espera (G1). Nas células animais em cultura, o processo completo consome cerca de 24 horas.

Após passar pela mitose e entrar em G1, a célula entra em outro ciclo de divisão, ou não se divide mais, entrando em uma fase quiescente (G0) que pode durar horas, dias ou todo o resto da vida da célula. Quando uma célula em G0 começa a se dividir novamente, ela reentra no ciclo de divisão pela fase G1. As células diferenciadas, como hepatócitos ou adipócitos, adquiriram forma e função especializadas; elas permanecem na fase G0. As células-tronco retêm o potencial de divisão e de se diferenciarem em qualquer um de vários tipos celulares.

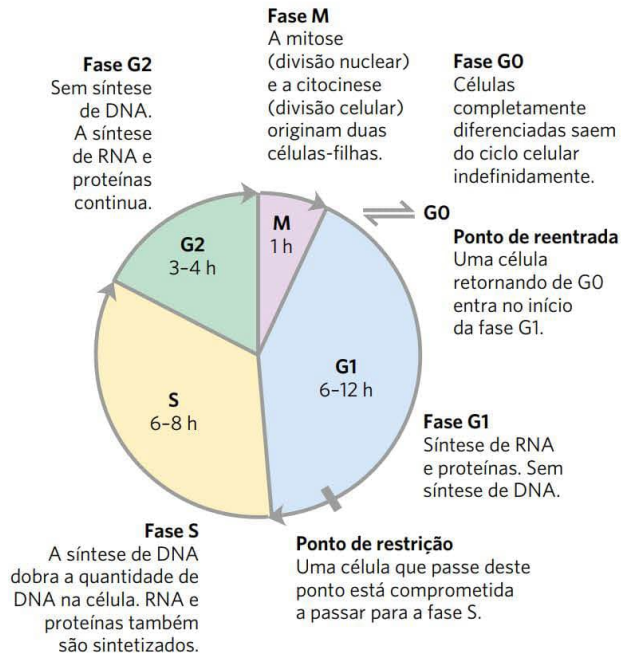


FIGURA 12-32 Ciclo de vida das células eucarióticas. As durações (em horas) dos quatro estágios variam, porém as apresentadas aqui são típicas.

Os níveis de proteínas-cinase dependentes de ciclina oscilam

A sincronia do ciclo celular é controlada por uma família de proteínas-cinase cujas atividades variam em resposta a sinais celulares. Por meio da fosforilação de proteínas específicas em intervalos de tempo precisamente cronometrados, estas proteínas-cinase coordenam as atividades metabólicas da célula para efetuar a divisão celular ordenada. As cinases são heterodímeros com uma subunidade de regulação, a **ciclina**, e uma subunidade catalítica, a **proteína-cinase dependente de ciclina (CDK, do inglês, cyclin-dependent protein kinase)**. Na ausência de ciclina, a subunidade catalítica é praticamente inativa. Quando a ciclina se liga, o sítio catalítico abre-se, de modo que um resíduo essencial para a catálise fica acessível e a atividade de proteína-cinase da subunidade catalítica aumenta 10 mil vezes. As células animais têm pelo menos 10 ciclinas diferentes (designadas A, B, e assim por diante) e pelo menos 8 CDK (de CDK1 a CDK8) que trabalham em diferentes combinações em pontos específicos do ciclo celular. As plantas também utilizam uma família de CDK para regular a divisão celular nas raízes e nos meristemas dos brotos, os principais tecidos nos quais ocorre divisão.

Em uma população de células animais dividindo-se sincronizadamente, as atividades de algumas CDK apresentam oscilações marcadas (**Figura 12-33**). Essas oscilações são o resultado de quatro mecanismos de regulação das atividades das CDK: fosforilação ou desfosforilação da CDK, degradação controlada da subunidade ciclina, síntese periódica de CDK e ciclinas e a ação das proteínas inibidoras específicas de CDK. A ativação e a inativação precisamente cronometradas de uma série de CDK produzem os sinais que

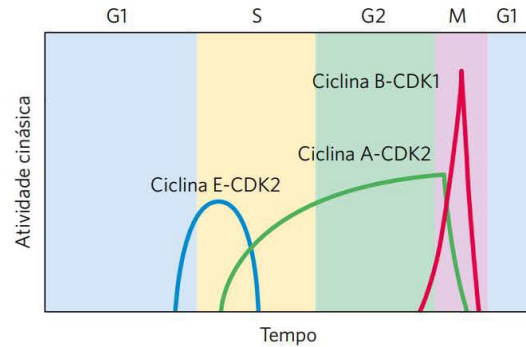


FIGURA 12-33 As variações nas atividades das CDK específicas durante o ciclo celular em animais. A atividade da ciclina E-CDK2 tem um pico próximo ao limite entre as fases G1 e S, quando a enzima ativa desencadeia a síntese das enzimas necessárias para a síntese de DNA (ver Figura 12-37). A atividade da ciclina A-CDK2 aumenta durante as fases S e G2, e então diminui repentinamente na fase M, quando a ciclina B-CDK1 apresenta um pico. A ciclina D permanece ativa enquanto um fator de crescimento estiver presente (não mostrado). [Fonte: dados de J. Pines, *Nature Cell Biol.* 1:E73, 1999.]

agem como o relógio-mestre, que rege os eventos da divisão celular normal e garante que um estágio seja completado antes que o próximo inicie.

Regulação das CDK por fosforilação A atividade da CDK é surpreendentemente afetada por fosforilação e desfosforilação de dois resíduos cruciais na proteína (**Figura 12-34**). A fosforilação da Thr¹⁶⁰ da CDK2 estabiliza uma conformação na qual a alça inibitória T se move para longe da fenda de ligação ao substrato na cinase, abrindo-a para que proteínas substrato possam se ligar. A desfosforilação da fosfo-Tyr¹⁵ da CDK2 remove a carga negativa que impede que o ATP se aproxime do sítio ao qual ele se liga. Esse mecanismo de ativação da CDK se autorreforça. A enzima que desfosforila a fosfo-Tyr¹⁵ é, por si só, substrato para a CDK e é ativada por fosforilação. A combinação de todos esses fatores ativa a CDK em muitas vezes, fazendo ela fosforilar proteínas-alvo cruciais para que o ciclo celular progrida (**Figura 12-35a**).

A presença de fitas simples de DNA rompidas sinaliza para a parada do ciclo celular em G2 pela ativação de duas proteínas (ATM e ATR; ver Figura 12-37). Essas proteínas disparam uma cascata de respostas que incluem a inativação da PTP, que desfosforila o resíduo Tyr¹⁵ da CDK. Com a CDK inativada, a célula fica presa em G2, incapaz de se dividir até que o DNA seja reparado e os efeitos da cascata revertidos.

A degradação da ciclina é controlada A degradação por proteólise altamente específica e precisamente cronometrada de ciclinas mitóticas regula a atividade da CDK por todo o ciclo celular (Figura 12-35b). O prosseguimento da mitose necessita primeiro de ativação e depois da destruição das ciclinas A e B, que ativam a subunidade catalítica da CDK da fase M. Essas ciclinas contêm perto da extremidade aminoterminal a sequência –Arg–Thr–Ala–Leu–Gly–Asp–Ile–Gly–Asn–, a “caixa de destruição” que marca as proteínas para serem degradadas. (O uso do termo “caixa” refere-se à prática comum, na diagramação de sequências de ácidos nucleicos ou

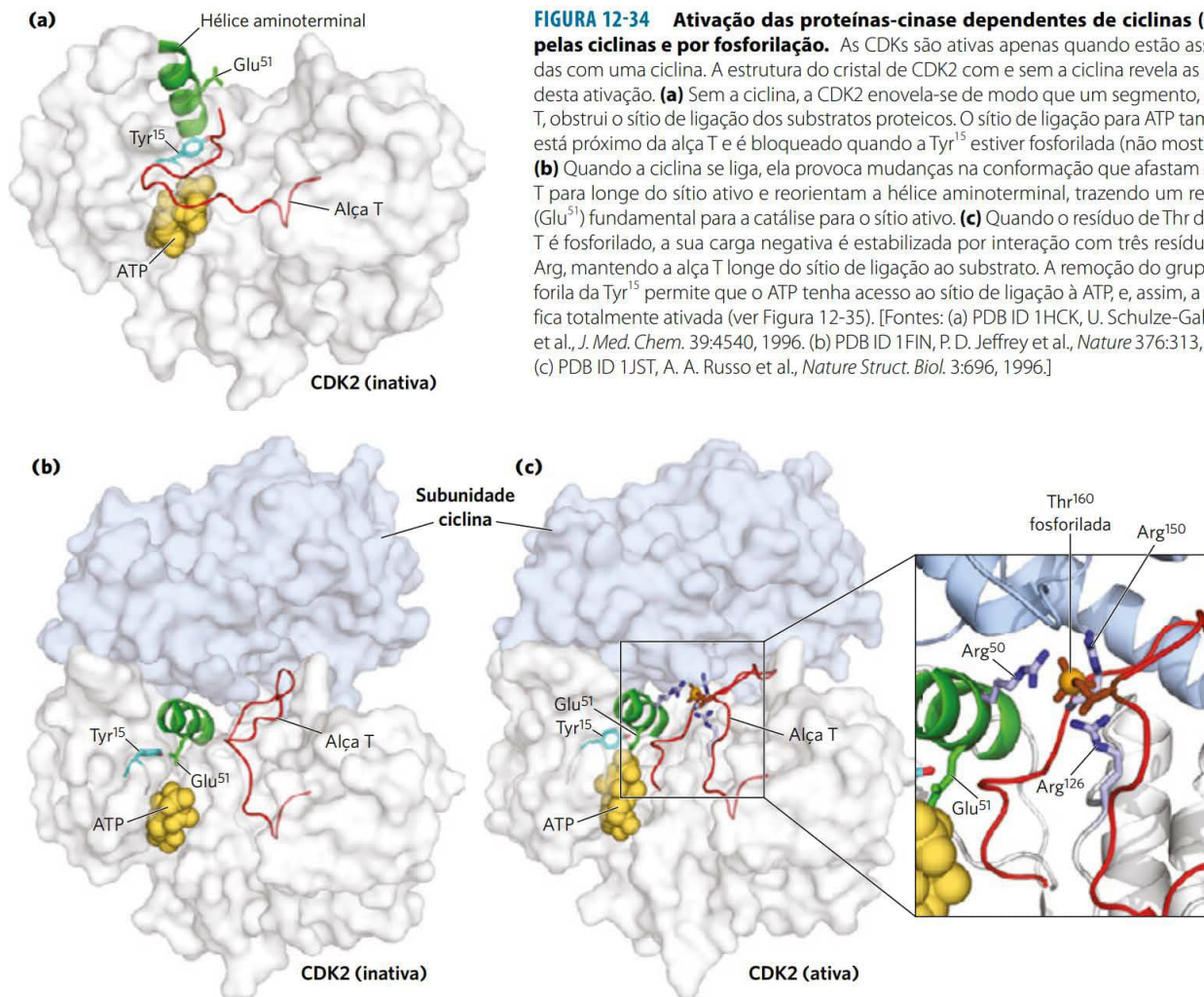


FIGURA 12-34 Ativação das proteínas-cinase dependentes de ciclinas (CDK) pelas ciclinas e por fosforilação. As CDKs são ativas apenas quando estão associadas com uma ciclina. A estrutura do cristal de CDK2 com e sem a ciclina revela as bases desta ativação. **(a)** Sem a ciclina, a CDK2 enovela-se de modo que um segmento, a alça T, obstrui o sítio de ligação dos substratos proteicos. O sítio de ligação para ATP também está próximo da alça T e é bloqueado quando a Tyr¹⁵ estiver fosforilada (não mostrado). **(b)** Quando a ciclina se liga, ela provoca mudanças na conformação que afastam a alça T para longe do sítio ativo e reorientam a hélice aminoterminal, trazendo um resíduo (Glu⁵¹) fundamental para a catálise para o sítio ativo. **(c)** Quando o resíduo de Thr da alça T é fosforilado, a sua carga negativa é estabilizada por interação com três resíduos de Arg, mantendo a alça T longe do sítio de ligação ao substrato. A remoção do grupo fosforil da Tyr¹⁵ permite que o ATP tenha acesso ao sítio de ligação à ATP, e, assim, a CDK2 fica totalmente ativada (ver Figura 12-35). [Fontes: (a) PDB ID 1HCK, U. Schulze-Gahmen et al., *J. Med. Chem.* 39:4540, 1996. (b) PDB ID 1FIN, P.D. Jeffrey et al., *Nature* 376:313, 1995. (c) PDB ID 1JST, A. A. Russo et al., *Nature Struct. Biol.* 3:696, 1996.]

proteínas, de representar uma curta sequência com função específica em uma caixa. Isso não implica qualquer estrutura tridimensional.) A proteína DBRP (proteína de reconhecimento da caixa de destruição) reconhece essa sequência e inicia o processo de degradação da ciclina, juntando a ciclina com outra proteína, a **ubiquitina**. A ciclina e a ubiquitina ativada são unidas covalentemente pela enzima ubiquitina-ligase. Várias moléculas de ubiquitina são anexadas dessa mesma maneira, fornecendo o sinal para um complexo enzimático proteolítico, ou **proteassomo**, degradar a ciclina.

Como o momento certo da degradação da ciclina é controlado? Uma alça de retroalimentação ocorre dentro do processo geral mostrado na Figura 12-35. A elevada atividade da CDK (etapa 4) culmina na proteólise da ciclina (etapa 8). A ciclina recém-sintetizada se associa e ativa a CDK, que fosforila e ativa a DBRP. A DBRP ativa provoca, então, a proteólise da ciclina. O decréscimo no nível de ciclina causa um declínio na atividade da CDK, e a atividade da DBRP também é reduzida, por desfosforilação e inativação lentas e constantes, com a ajuda de uma DBRP-fosfatase. O nível de ciclina é, ao final, restaurado pela síntese de novas moléculas de ciclina.

A função da ubiquitina e dos proteassomos não se limita à regulação das ciclinas (será visto no Capítulo 27), pois também estão envolvidos na renovação das proteínas celulares, processo fundamental para a manutenção celular.

Fatores de crescimento estimulam a CDK e a síntese de ciclina O terceiro mecanismo para modificar a atividade da CDK é a regulação da velocidade de síntese da ciclina, da CDK ou de ambas. Sinais extracelulares, como **fatores de crescimento** e citocinas (sinais para o desenvolvimento celular que ativam a divisão celular), ativam, por fosforilação, os fatores nucleares de transcrição Jun e Fos, que estimulam a síntese de muitos produtos gênicos, incluindo ciclinas, CDKs e o fator de transcrição E2F. E2F, por sua vez, estimula a produção de várias enzimas essenciais para a síntese de desoxirribonucleotídeos e DNA e CDKs. As ciclinas permitem que a célula entre na fase S (**Figura 12-36**).

Inibição das CDKs Finalmente, inibidores proteicos específicos ligam-se e inativam CDK específicas. Uma dessas proteínas é a p21, discutida a seguir.

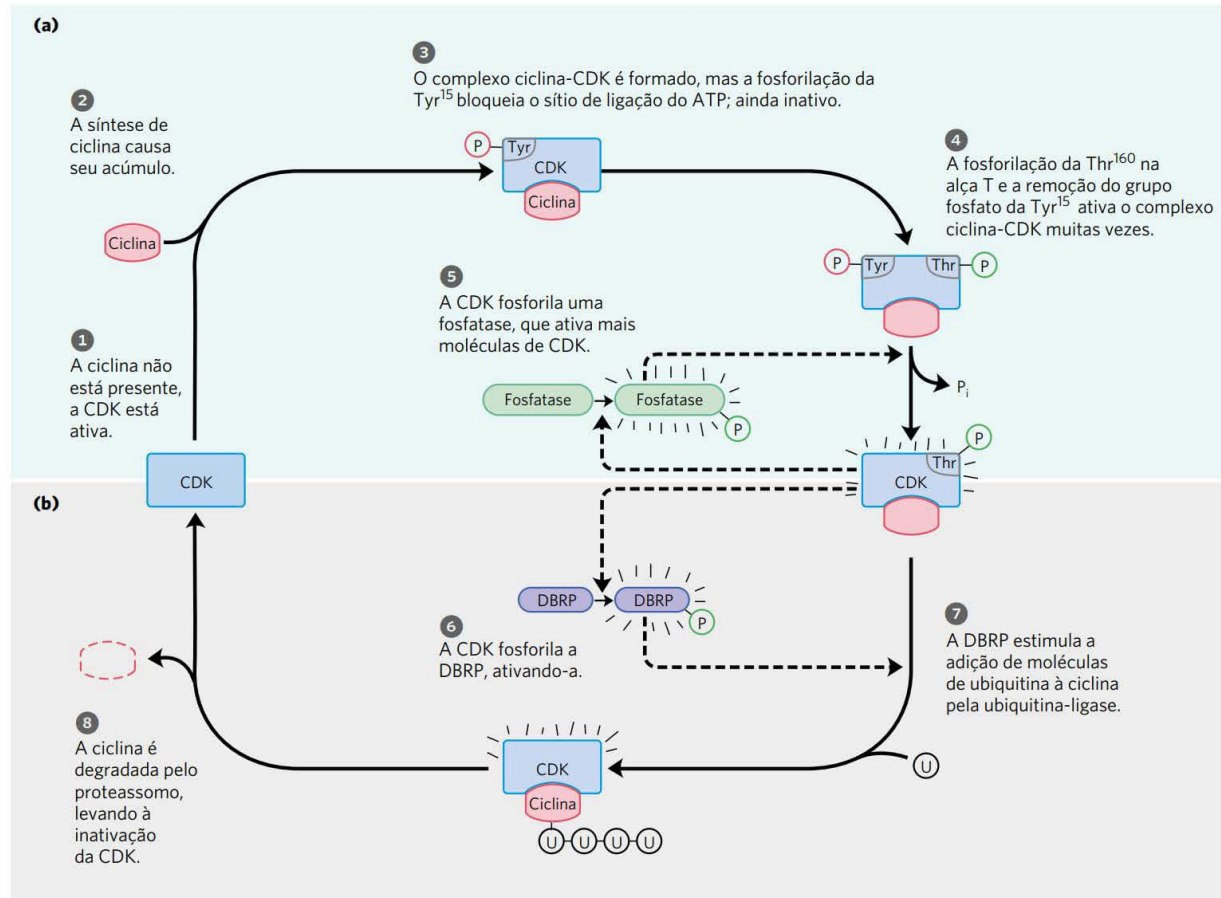


FIGURA 12-35 Regulação das CDK por fosforilação e proteólise. (a) Logo que a célula entra em mitose, a CDK da fase M é inativada (etapa 1). Assim que a ciclina é sintetizada (etapa 2), forma-se o complexo ciclina-CDK (etapa 3). A alça T repousa sobre o sítio de ligação ao substrato da CDK e a fosfo-Tyr¹⁵ bloqueia o sítio de ligação a ATP, deixando o complexo inativo. Quando a Thr¹⁶⁰ da alça T é fosforilada, a alça move-se para fora do sítio de ligação ao substrato e o ATP se liga quando a Tyr¹⁵ é desfosforilada. Essas duas modificações ativam o complexo ciclina-CDK muitas vezes (etapa 4). Uma ativação adicional ocorre quando a CDK também fosforila e ativa a enzima que desfosforila a (P)-Tyr¹⁵ (etapa 5). (b) O complexo ciclina-CDK ativo inicia sua própria inativação pela fosforilação da DBRP (proteína de reconhecimento de caixas de destruição; etapa 6). A DBRP e a ubiquitina-ligase, então, ligam várias moléculas de ubiquitina (U) na ciclina (etapa 7), direcionando-a para a degradação proteolítica por complexos enzimáticos, denominados proteassomos (etapa 8).

Esses quatro mecanismos de controle modulam a atividade de CDKs específicas, as quais, por sua vez, controlam se a célula irá se dividir, diferenciar-se, tornar-se quiescente permanentemente ou começar um novo ciclo de divisão após um período de quiescência. Os detalhes da regulação do ciclo celular, como o número de diferentes ciclinas e cinases e as combinações nas quais elas agem, diferem de espécie para espécie, porém o mecanismo básico tem sido conservado na evolução de todas as células eucarióticas.

As CDKs regulam a divisão celular pela fosforilação de proteínas cruciais

Foi examinado como as células mantêm um rigoroso controle da atividade das CDK, mas como a atividade das CDK controla o ciclo celular? A lista de proteínas-alvo reguladas pelas CDKs continua a crescer, e muitas ainda estão para serem descobertas. É possível, porém, observar um padrão

geral por trás da regulação pelas CDKs examinando o efeito das CDKs sobre a estrutura da lamina e da miosina e sobre a atividade da proteína do retinoblastoma.

A estrutura do envelope nuclear é mantida, em parte, por redes altamente organizadas de filamentos intermediários, compostos pela proteína **lamina**. O desmantelamento do envelope nuclear antes da segregação das cromátides-irmãs na mitose deve-se parcialmente à fosforilação da lamina por uma CDK, que causa a despolimerização dos filamentos de lamina.

Um segundo alvo da cinase é a maquinaria contrátil impelida por ATP (actina e miosina) que separa uma célula em divisão em duas partes iguais durante a citocinese. Após a divisão, a CDK fosforila uma pequena subunidade de regulação da miosina, causando a dissociação da miosina dos filamentos de actina e inativando a maquinaria contrátil. A posterior desfosforilação possibilita a remontagem do aparato contrátil para a próxima rodada de citocinese.

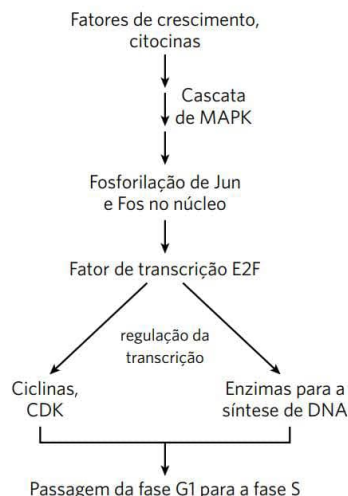


FIGURA 12-36 Regulação da divisão celular por fatores de crescimento. A via desde os fatores de crescimento até a divisão celular passa pela cascata enzimática que ativa MAPK, pela fosforilação dos fatores de transcrição nucleares Jun e Fos e pela atividade do fator de transcrição E2F, que promove a síntese de algumas enzimas essenciais à síntese de DNA.

Um terceiro substrato da CDK muito importante é a **proteína do retinoblastoma, pRb**. Quando algum dano no DNA é detectado, essa proteína participa de um mecanismo que cessa a divisão celular em G1 (**Figura 12-37**). Assim denominada devido à linhagem celular tumoral em que foi descoberta, a pRb atua na maioria dos tipos de células, talvez em todos, para regular a divisão celular em resposta a uma grande variedade de estímulos. A pRb não fosforilada se liga ao fator de transcrição E2F. Enquanto permanecer ligado à pRb, o E2F não consegue estimular a transcrição de um grupo de genes necessários para a síntese de DNA (os genes da DNA-polimerase α , da ribonucleotídeo-redutase e de outras proteínas; ver Capítulo 25). Nesse estágio, o ciclo celular não pode progredir da fase G1 para a fase S, a fase que compromete a célula com a mitose e a divisão celular. O mecanismo de bloqueio pRb-E2F é interrompido quando pRb é fosforilada pela ciclina E-CDK2, o que ocorre em resposta a um sinal para a divisão celular avançar.

Quando as proteínas-quinase ATM e ATR detectam dano no DNA (sinalizado pela presença da proteína MRN em um local com quebra na dupla-fita), elas fosforilam a proteína p53, ativando-a para atuar como um fator de transcrição que estimula a síntese da proteína p21 (**Figura 12-37**). Essa proteína inibe a atividade da proteína-quinase da ciclina E-CDK2. Na presença de p21, a pRb permanece não fosforilada e ligada a E2F, bloqueando a atividade desse fator de transcrição, e a célula fica parada em G1. Isso garante à célula tempo para reparar o DNA antes de entrar na fase S, evitando a potencialmente desastrosa transferência de um genoma defeituoso a uma ou ambas as células-filhas. Quando o dano é grave demais para ser efetivamente reparado, essa mesma maquinaria dispara a apoptose (descrita a seguir), um processo que leva à morte da célula, impedindo o possível desenvolvimento de um câncer.

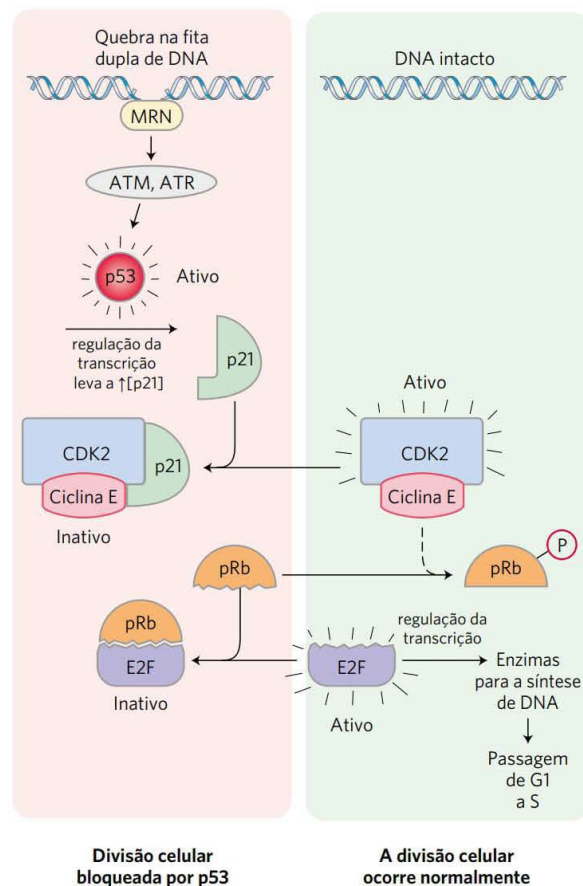


FIGURA 12-37 Regulação da passagem de G1 a S pela fosforilação de pRb. O fator de transcrição E2F promove a transcrição dos genes de certas enzimas essenciais para a síntese do DNA. A proteína do retinoblastoma, pRb, pode ligar-se a E2F (embaixo, à esquerda), inativando-o e impedindo a transcrição desses genes. A fosforilação da pRb pela CDK2 impede-a de ligar-se e inativar E2F, os genes são transcritos e é possível haver divisão celular. Danos ao DNA da célula (em cima, à esquerda) provocam uma série de eventos que inativam a CDK2, bloqueando a divisão celular. Quando a proteína MRN detecta dano no DNA, ela ativa duas proteínas-quinase, ATM e ATR, as quais fosforilam e ativam o fator de transcrição, a proteína p53. A p53 ativa promove a síntese de outra proteína, p21, um inibidor de CDK2. A inibição da CDK2 interrompe a fosforilação de pRb, que, portanto, continua a ligar-se a E2F, que permanece inibido. Com E2F inativado, os genes essenciais para a divisão celular não são transcritos, e a divisão celular é bloqueada. Após o reparo do DNA, esta inibição é liberada, e a célula divide-se.

RESUMO 12.10 Regulação do ciclo celular por proteínas-quinase

- A progressão durante o ciclo celular é regulada pelas proteínas-quinase dependentes de ciclina (CDK), que agem em pontos específicos do ciclo, fosforilando proteínas-chave e modulando suas atividades. A subunidade catalítica das CDKs permanece inativa quando não associada com a subunidade de regulação ciclina.
- A atividade de um complexo ciclina-CDK varia durante o ciclo celular pela síntese diferenciada das CDK, degradação específica de ciclinas, fosforilação e desfosforila-

ção de resíduos cruciais nas CDK e ligação de inibidores proteicos a complexos ciclina-CDK específicos.

- Entre os alvos fosforilados pelas ciclinas-CDK estão proteínas do envelope nuclear e proteínas necessárias para a citocinese e o reparo do DNA.

12.11 Oncogenes, genes supressores de tumor e morte celular programada

Tumores e cânceres são o resultado da divisão celular descontrolada. Normalmente, a divisão celular é regulada por uma família de fatores de crescimento extracelulares, proteínas que levam células em repouso a se dividirem e, em alguns casos, diferenciarem-se. Isso leva a um balanço preciso entre a formação de novas células e a destruição celular. A regulação da divisão celular garante que as células da pele sejam substituídas a cada poucas semanas e que os leucócitos sejam substituídos a cada poucos dias. Quando esse equilíbrio é perturbado por defeitos nas proteínas de regulação, o resultado, algumas vezes, é a formação de um clone celular que se divide repetidamente e sem regulação (um tumor), até que a sua presença interfira com o funcionamento dos tecidos normais – um câncer. A causa direta é quase sempre um defeito genético em uma ou mais das proteínas que regulam a divisão celular. Em alguns casos, um gene defeituoso é herdado de um dos pais. Em outros casos, a mutação ocorre quando um composto tóxico do meio ambiente (composto mutagênico ou carcinogênico), ou mesmo radiação de alta energia, interage com o DNA de uma única célula, danifica-o e introduz uma mutação. Na maioria dos casos, os dois fatores contribuem, hereditário e ambiental, e é necessário haver mais de uma mutação para causar a completa desregulação da divisão e o desenvolvimento de câncer.

Os oncogenes são formas mutantes dos genes de proteínas que regulam o ciclo celular



Os **oncogenes** são versões mutadas de genes que codificam proteínas sinalizadoras envolvidas na regulação do ciclo celular. Eles foram originalmente descritos em vírus causadores de tumor, sendo posteriormente descoberto que eram derivados de genes das próprias células hospedeiras animais, os **proto-oncogenes**, que codificam proteínas reguladoras do crescimento. Durante uma infecção viral, a sequência de DNA de um proto-oncogene do hospedeiro é, algumas vezes, copiada para dentro do genoma viral, onde ela prolifera juntamente com o vírus. Nos ciclos de infecção seguintes, os proto-oncogenes podem se tornar defeituosos por mutações ou deleções. Os vírus, diferentemente das células animais, não têm mecanismos efetivos para a correção de erros durante a replicação do DNA, de modo que acumulam mutações rapidamente. Quando um vírus portando um oncogene infecta uma nova célula hospedeira, o DNA viral (e o oncogene) pode ser incorporado ao DNA da célula hospedeira, na qual ele pode, agora, interferir na regulação da divisão celular. Em um mecanismo alternativo, não viral, uma única célula em um tecido exposto a compostos carcinogênicos pode sofrer um dano ao DNA que torne uma de suas proteínas reguladoras defeituosa, com o

mesmo efeito do mecanismo oncogênico: falhas na regulação da divisão celular. ■

As mutações que originam oncogenes são geneticamente dominantes; se um cromossomo de um par contiver um gene defeituoso, o produto daquele gene enviará o sinal “divida-se”, o que poderá resultar em um tumor. O defeito oncogênico pode estar em qualquer uma das proteínas envolvidas na comunicação do sinal “divida-se”. Os oncogenes descobertos até agora incluem aqueles que codificam para proteínas secretadas que atuam como moléculas sinalizadoras, fatores de crescimento, proteínas transmembrana (receptores), proteínas citoplasmáticas (proteínas G e proteínas-cinase) e fatores nucleares de transcrição que controlam a expressão de genes essenciais para a divisão celular (Jun e Fos).

Alguns oncogenes codificam receptores de superfície com sítios de ligação a sinais defeituosos ou ausentes, de modo que sua atividade tirosina-cinase intrínseca fica desregulada. Por exemplo, a oncoproteína EGF é essencialmente idêntica ao receptor normal do fator de crescimento epitelial, exceto pelo fato de que ErbB não possui o domínio aminoterminal que normalmente liga EGF (**Figura 12-38**) e, consequentemente, fica congelada na conformação ativada. O resultado é que a proteína mutante ErbB envia sinais de “divida-se” estando EGF presente ou não. As mutações no gene *erbB2*, o gene de um receptor tirosina-cinase relacionado à ErbB, são comumente associadas com os cânceres do epitélio glandular em mama, estômago e ovário. (Consultar explicação sobre o uso de abreviações na denominação de genes e seus produtos no Capítulo 25.)

O importante papel desempenhado pelas proteínas-cinase nos processos de sinalização relacionados à divisão celular normal e anormal as coloca como um dos principais alvos no desenvolvimento de fármacos para o tratamento de câncer (**Quadro 12-4**). Formas mutantes da proteína G Ras são comuns em células tumorais. O oncogene *ras* codi-

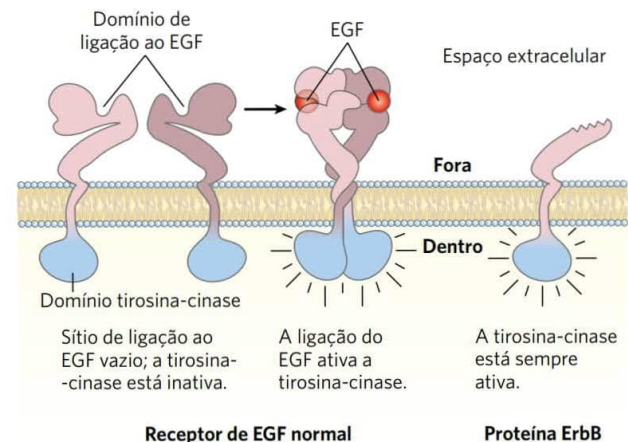


FIGURA 12-38 Receptores defeituosos de EGF codificados por oncogenes. O produto do oncogene *erbB2* (a proteína ErbB) é uma versão truncada do receptor normal para o fator de crescimento da epiderme (EGF). O domínio intracelular apresenta a estrutura normalmente induzida pela ligação do EGF, porém a proteína não tem o sítio extracelular de ligação a EGF. Não sendo regulada pelo EGF, a ErbB continuamente sinaliza a divisão celular.

QUADRO 12-4



MEDICINA

O desenvolvimento de inibidores de proteínas-quinase para o tratamento de câncer

Quando uma única célula se divide sem qualquer limitação regulatória, ela originará, no final, um clone de células tão grande que ele interferirá com as funções fisiológicas normais (Figura Q-1). Isso é câncer, uma das principais causas de morte nos países desenvolvidos e em expansão nos países em desenvolvimento. Em todos os tipos de câncer, a regulação normal da divisão celular ficou disfuncional devido aos defeitos em um ou mais genes. Por exemplo, os genes que codificam proteínas que normalmente emitem sinais intermitentes para a divisão celular tornam-se oncogenes, originando proteínas sinalizadoras constitutivamente ativas. Também ocorre que os genes que codificam proteínas que normalmente reprimem a divisão celular (genes supressores de tumor) são mutados e acabam originando proteínas sem essa função de controle. Em muitos tumores, os dois tipos de mutações ocorrem.

Muitos oncogenes e genes supressores de tumor codificam proteínas-quinase ou proteínas que atuam nas rotas de sinalização em posições na via que se situam anteriormente às proteínas-quinase. É, portanto, lógico imaginar que inibidores específicos de proteínas-quinase se mostrariam úteis para o tratamento de câncer. Por exemplo, uma forma mutante do receptor de EGF é um receptor tirosina-quinase (RTK) constantemente ativo, sinalizando, portanto, a divisão celular esteja o EGF presente ou não (ver Figura 12-38). Em cerca de 30% das mulheres com câncer de mama invasivo, uma mutação no gene do receptor HER2/neu produz uma RTK com atividade cem vezes maior. Outro RTK, o **receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR)**, do inglês, *vascular endothelial growth factor receptor*, deve ser ativado para que a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) forneça a um tumor sólido seu próprio suprimento de sangue, e a inibição do VEGFR pode privar um tumor de nutrientes essenciais. As tirosinas-quinase que não participam de receptores também podem ser mutadas, resultando em constante sinalização e divisão celular desregulada. Por exemplo, o oncogene *Abl* (do



FIGURA Q-1 A divisão desregulada de uma única célula do colo levou a um câncer primário que formou metástases que foram para o fígado. Os cânceres secundários estão visualizados como manchas brancas neste fígado obtido em uma necropsia. [Fonte: CNRI/Science Source.]

vírus da leucemia de Abelson) é associado à leucemia mieloide aguda, uma doença sanguínea relativamente rara (~ 5.000 casos por ano nos Estados Unidos). Outro grupo de oncogenes codifica proteínas-quinase dependentes de ciclina desreguladas. Em cada um desses casos, inibidores específicos de proteínas-quinase poderiam ser agentes quimioterápicos valiosos para o tratamento da doença. Não surpreendentemente, estão sendo feitos esforços enormes para o desenvolvimento desses inibidores. Como abordar esse desafio?

As proteínas-quinase de todos os tipos apresentam uma notável conservação na estrutura do sítio ativo. Todas compartilham as características da estrutura prototípica da PKA, mostradas na Figura Q-2: dois lobos que circundam o sítio ativo, com uma alça P que auxilia no alinhamento e na ligação dos grupos fosfato do ATP, uma alça de ativação que se move para a abertura do sítio ativo ao substrato proteico e uma hélice C que muda de posição quando a enzima é ativada, trazendo os resíduos da fenda de ligação ao substrato até suas posições de ligação.

Os inibidores de proteínas-quinase mais simples são os análogos de ATP, que ocupam o sítio de ligação do ATP, mas não servem como doadores de grupos fosfato. Muitos desses compostos são conhecidos, porém sua utilidade clínica é limitada pela falta de seletividade. Eles inibem praticamente todas as proteínas-quinase e provocariam efeitos

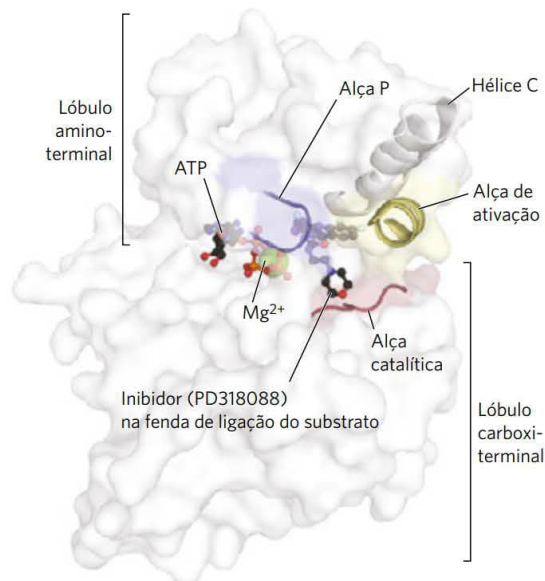


FIGURA Q-2 Características conservadas dos sítios ativos das proteínas-quinase. Os lóbulos aminoterminal e carboxiterminal circundam o sítio ativo da enzima, próximos à alça catalítica e ao sítio onde o ATP se liga. A alça de ativação desta e de muitas outras cinases é fosforilada e, então, afasta-se do sítio ativo para expor a fenda de ligação ao substrato, a qual, nesta imagem, está ocupada por um inibidor específico desta enzima, PD318088. A alça P é essencial para a ligação do ATP, e a hélice C também deve estar corretamente alinhada para a ligação do ATP e a atividade cinásica. [Fonte: PDB ID 1S9I, J. F. Ohren et al., *Nature Struct. Mol. Biol.* 11:1192, 2004.]

colaterais intoleráveis. Maior seletividade é encontrada nos compostos que ocupam parte do sítio de ligação do ATP, porém interagem também fora desse sítio, com regiões da proteína exclusivas da proteína-cinase-alvo. Uma terceira estratégia possível tem como base o fato de que, embora as conformações ativas de todas as proteínas-cinase sejam semelhantes, suas conformações inativas não o são. Os fármacos direcionados à conformação inativa de uma proteína-cinase específica impedem sua conversão à forma ativa e apresentam maior especificidade de ação. Uma quarta abordagem utiliza a grande especificidade dos anticorpos. Por exemplo, anticorpos monoclonais (p. 177) que se ligam às porções extracelulares de RTK específicos podem bloquear a atividade cinásica do receptor por impedirem a dimerização ou por causarem a sua remoção da superfície celular. Em alguns casos, um anticorpo seletivamente ligado à superfície de células cancerosas poderia estimular o sistema imune a atacar aquelas células.

A pesquisa na busca de fármacos ativos contra proteínas-cinase específicas tem produzido resultados encorajadores. Por exemplo, o mesilato de imatinibe (Glivec; Figura Q-3a), uma das pequenas moléculas inibidoras, tem mostrado uma eficácia de praticamente 100% na regressão em pacientes nos estágios iniciais de leucemia mieloide crônica. O erlotinibe (Tarceva; Figura Q-3b), direcionado ao EGFR, tem efeito no tratamento de câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC, do inglês, *non-small-cell lung cancer*) avançado. Como muitos sistemas de sinalização para a divisão celular envolvem mais de uma proteína-cinase, os inibidores que agem sobre diferentes proteínas-cinase podem ser úteis para o tratamento de câncer. O sunitinibe (Sutent) e o sorafenibe (Nexavar) têm diversas proteínas-cinase como alvos, incluindo VEGFR e PDGFR. Esses dois fármacos estão em uso clínico em pacientes com tumores do estroma gastrointestinal e adenocarcinoma renal avançado, respectivamente. O trastuzumabe (Herceptin), o cetuximabe (Erbix) e o bevacizumabe (Avastin) são anticorpos monoclonais direcionados a HER2/neu, EGFR e VEGFR, respectivamente. Esses três fármacos já estão em uso clínico para determinados tipos de câncer. O conhecimento detalhado da estrutura ao redor do sítio de ligação do ATP torna possível o desenho de fármacos que inibam uma proteína-cinase *específica* por (1) bloquear o sítio de ligação do ATP crucial, enquanto (2) interagem com resíduos ao redor desse sítio que sejam *únicos* para essa proteína-cinase em particular.

Pelo menos mais outros 100 compostos estão em fase pré-clínica. Entre os fármacos em fase de avaliação estão alguns obtidos a partir de fontes naturais e alguns produzidos por síntese química. A indirubina é um componente de um preparado de ervas chinês tradicionalmente utilizado para tratar certas leucemias; ela inibe CDK2 e CDK5. A roscovitina (Figura Q-3d), uma adenina substituída, tem um anel benzila que a torna altamente específica como um inibidor da CDK2. Com algumas centenas de potenciais fármacos anticâncer entrando na fase de testes clínicos, é bem provável que alguns se mostrarão mais efetivos ou mais específicos do que os fármacos atualmente em uso.

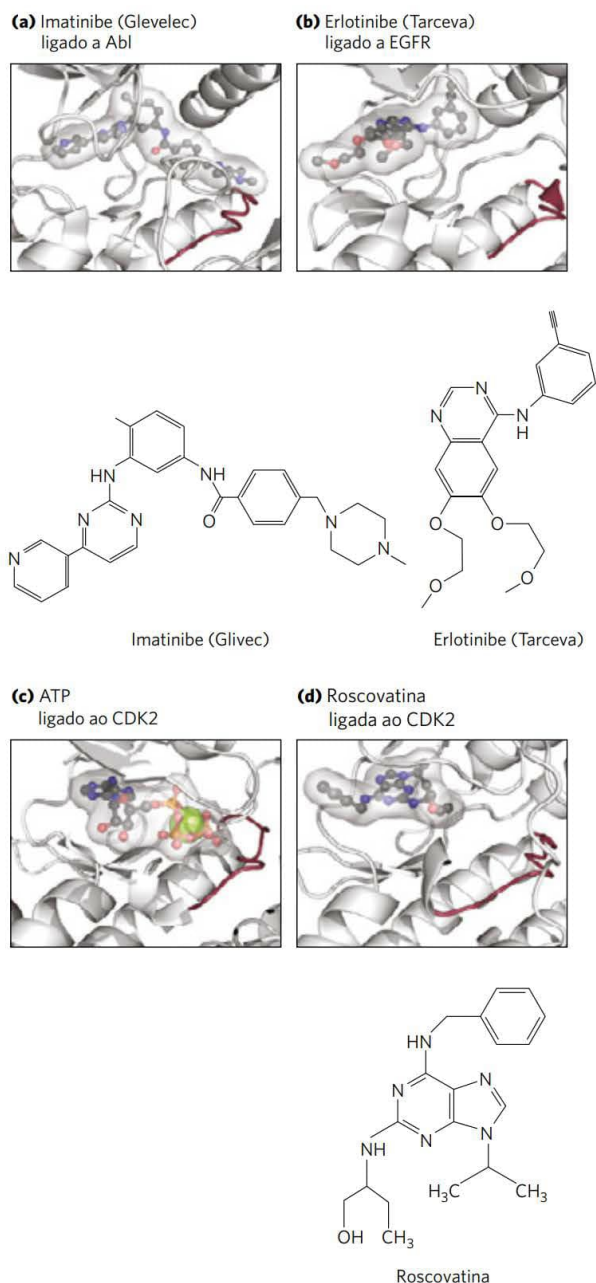


FIGURA Q-3 Alguns inibidores de proteínas-cinase atualmente em testes clínicos ou em uso clínico, mostrando sua ligação à proteína-alvo. **(a)** Imatinibe liga-se ao sítio ativo da Abl-cinase (um produto de oncogene), ocupando tanto o sítio de ligação a ATP quanto a um sítio adjacente a este. **(b)** Erlotinibe liga-se ao sítio ativo da EGFR. **(c), (d)** Roscovitina é um inibidor de cinases dependentes de ciclina, CDK2, CDK7 e CDK9 mostradas na figura com Mg^{2+} -ATP ligado ao sítio ativo (c) e com roscovitina ligada (d), que impede a ligação de ATP. [Fontes: (a) PDB ID 1IEP, B. Nagar et al., *Cancer Res.* 62:4236, 2002. (b) PDB ID 1M17, J. Stamos et al., *J. Biol. Chem.* 277:46.265, 2002. (c) PDB ID 1S9I, J. F. Ohren et al., *Nature Struct. Mol. Biol.* 11:1192, 2004. (d) PDB ID 2A4L, W. F. De Azevedo et al., *Eur. J. Biochem.* 243:518, 1997.]

fica uma proteína que normalmente se liga ao GTP, porém sem atividade GTPásica. A proteína Ras mutante está, portanto, sempre na forma ativada (ligada a GTP), independentemente dos sinais que cheguem através dos receptores normais. O resultado pode ser o crescimento desregulado. As mutações no *ras* estão associadas com 30 a 50% dos carcinomas de pulmão e colo, e com mais de 90% dos carcinomas pancreáticos.

Os defeitos em determinados genes eliminam a inibição normal da divisão celular



Os **genes supressores de tumor** codificam proteínas que normalmente inibem a divisão celular. As mutações em um ou mais desses genes podem levar à formação de tumores. O crescimento desregulado devido a genes supressores de tumor defeituosos, ao contrário do que ocorre com os oncogenes, é geneticamente recessivo. Os tumores formam-se somente se *ambos* os cromossomos de um par contiverem o gene defeituoso. Isso ocorre porque a função desses genes é inibir a divisão celular, e, caso as duas cópias do gene sejam normais, haverá a produção de uma proteína normal e uma inibição normal da divisão celular. Em uma pessoa que herde uma cópia correta e uma cópia defeituosa, todas as células terão uma cópia defeituosa do gene. Caso uma das 10^{12} células somáticas de uma pessoa sofra uma mutação na única cópia correta, haverá o crescimento de um tumor, pois a célula terá as duas cópias mutadas. As mutações nas duas cópias dos genes de pRb, p53 ou p21 originam células nas quais a inibição normal da divisão celular é perdida, e o tumor é formado.

O retinoblastoma ocorre em crianças e causa cegueira caso não tratado cirurgicamente. As células de um retinoblastoma têm duas formas defeituosas do gene *Rb* (dois alelos defeituosos). Crianças muito novas que desenvolvem retinoblastoma, em geral, apresentam múltiplos tumores em ambos os olhos. Essas crianças herdaram uma cópia defeituosa do gene *Rb*, que está presente em todas as células. Cada tumor é derivado de uma única célula da retina que sofreu uma mutação em sua cópia correta do gene *Rb*. (Um feto com os dois alelos mutantes em todas as células não sobrevive.) As pessoas com retinoblastoma que sobrevivem à infância acabam também apresentando uma alta incidência de cânceres de pulmão, próstata e mama.

Um evento muito menos provável é que uma pessoa nascida com duas cópias corretas do gene *Rb* sofra mutações independentes em ambas as cópias na *mesma* célula. Algumas crianças, de fato, desenvolvem retinoblastomas mais tarde ainda na infância, em geral apresentando tumor em um dos olhos. Essas pessoas, supostamente, nasceram com as duas cópias (alelos) corretas do *Rb* em todas as suas células, mas ambos os alelos *Rb* de uma mesma célula da retina sofreram mutação, levando ao tumor. Após a idade aproximada de 3 anos, as células da retina param de se dividir, e os retinoblastomas em idades mais avançadas são extremamente raros.

Os genes de estabilidade (também chamados de genes de manutenção) codificam proteínas que atuam no reparo dos principais defeitos genéticos que resultam da replicação aberrante do DNA, da radiação ionizante ou de compostos carcinogênicos do ambiente. As mutações nesses genes levam a uma alta frequência de danos não reparados (muta-

ções) em outros genes, incluindo proto-oncogenes e genes supressores de tumor, e, portanto, levam ao câncer. Entre os genes de estabilidade estão o *ATM* (ver Figura 12-37), a família de genes *XP*, na qual mutações levam ao xeroderma pigmentoso, e os genes *BRCA1*, associados a alguns tipos de câncer de mama (ver Quadro 25-1). As mutações no gene da p53 também causam tumores. Em mais de 90% dos carcinomas cutâneos de células escamosas (cânceres de pele) e em aproximadamente 50% de todos os outros cânceres humanos, o *p53* é defeituoso. Os indivíduos, extremamente raros, que herdam uma cópia defeituosa de *p53* geralmente apresentam a síndrome de Li-Fraumeni, com cânceres múltiplos (de mama, cérebro, ossos, sangue, pulmão e pele) que surgem com alta frequência na infância. A explicação para os tumores múltiplos nesse caso é a mesma das mutações do gene *Rb*: um indivíduo nascido com uma cópia defeituosa do *p53* em todas as células somáticas tem a probabilidade de sofrer uma segunda mutação no *p53* em mais de uma célula durante a vida.

Em resumo, três classes de defeitos contribuem para o desenvolvimento de câncer: (1) oncogenes, nos quais o defeito é equivalente ao pedal do acelerador de um carro pisado até o fundo, com aceleração do motor; (2) mutações em genes supressores de tumores, defeito equivalente a uma falha nos freios; e (3) mutação em genes estabilizadores, cujo defeito leva a não reparar danos na maquinaria da replicação celular, equivalente a um péssimo mecânico.

As mutações em oncogenes e genes supressores de tumor não apresentam um efeito tudo ou nada. Em alguns cânceres, talvez em todos, a progressão de uma célula normal a um tumor maligno requer o acúmulo de mutações (algumas vezes ao longo de décadas), nenhuma das quais, por si só, é responsável pelo resultado final. Por exemplo, o desenvolvimento de câncer colorretal apresenta alguns estágios distintos, cada um associado a uma mutação (**Figura 12-39**). Se uma célula epitelial do colo sofrer uma mutação em ambas as cópias do gene supressor de tumor *APC* (do inglês, *adenomatous polyposis coli* [polipose adenomatosa do colo]), ela começa a dividir-se mais rapidamente do que o normal e produz um clone dela mesma, um pólipó benigno (adenoma em estágio inicial). Por razões ainda desconhecidas, as mutações no *APC* resultam em instabilidade cromossômica e regiões inteiras de um cromossomo são perdidas ou rearranjadas durante a divisão celular. Essa instabilidade pode levar a outra mutação, comumente no gene *ras*, que converte o clone em um adenoma em estágio intermediário. Uma terceira mutação (frequentemente no gene supressor de tumor *DCC*) leva a um adenoma em estágio avançado. Somente quando ambas as cópias do *p53* estiverem defeituosas, essa massa de células se tornará um carcinoma – um tumor maligno, com risco de morte. A sequência completa, portanto, requer pelo menos sete “ataques” genéticos: dois em cada um dos três genes supressores tumorais (*APC*, *DCC* e *p53*) e um no proto-oncogene *ras*. É plausível que existam também outras vias que levem ao o câncer colorretal, mas o princípio de que a malignidade máxima resulta somente de múltiplas mutações provavelmente seja verdadeiro para todas elas. Uma vez que é necessário tempo para que as mutações se acumulem, a possibilidade de desenvolvimento de um câncer metastático maduro aumenta com a idade (Figura 12-39).

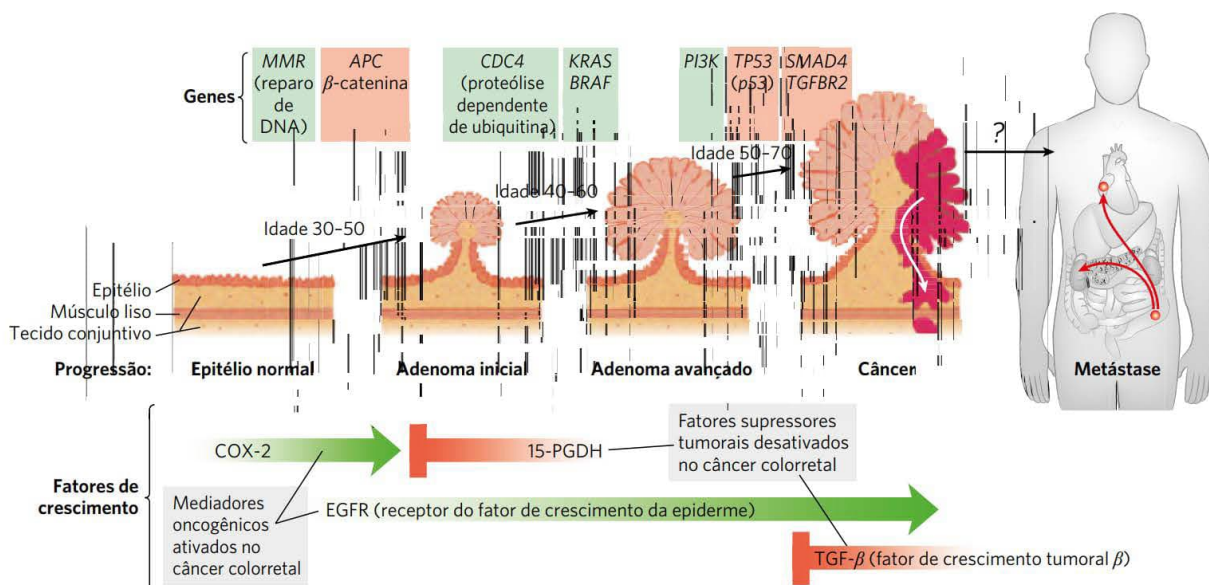


FIGURA 12-39 As múltiplas etapas da transição de uma célula epitelial normal até um câncer colorretal. Uma série de mutações em onco genes (em verde) ou em genes supressores de tumor (em vermelho) progressivamente leva à diminuição do controle da divisão celular, culminando na formação de um tumor ativo, o qual pode, algumas vezes, formar metástases (espalhar-se do local inicial para outras regiões do corpo). Mutações no gene *MMR* causam defeitos no reparo do DNA e, consequentemente, uma maior taxa de mutações. Mutações em ambas as cópias do gene supressor tumoral *APC* levam à formação de agrupamentos de células epiteliais, que se multiplicam muito rapidamente (adenoma em estágio inicial). O oncogene *CDC4* resulta em defeitos na ubiquitinação, que é essencial para a regulação das cinases dependentes de ciclina (ver Figura 12-35). Os oncogenes *KRAS* e *BRAF* codificam as proteínas Ras e Raf (ver Figura 12-19), e esta disfunção adicional da sinalização leva à formação de um adenoma avançado, que pode ser detectado por colonoscopia como um pólipó benigno. Mutações oncogênicas no gene *PI3K*, que codifica a enzima fosfoinositídeo-3-cinase, ou no gene *PTEN*, que regula a síntese dessa enzima, reforçam ainda mais o sinal: divida-se agora. Quando uma célula de um dos pólipos sofre uma mutação adicional, como nos genes supressores de tumores *DCC* e *p53* (ver Figura 12-37), há formação de tumores mais agressivos. Por fim, mutações em outros genes supressores de tumor, como *SMAD4*, levam a um tumor maligno e, algumas vezes, a um tumor metastático que pode se disseminar para outros tecidos. Um segundo tipo de mutação, que afete a produção ou ação de fatores de crescimento ou seus receptores (a seguir), pode aumentar os efeitos deletérios. Mutações na *EGFR* (do inglês, *epidermal growth factor receptor*) ou *TGF-β* (do inglês, *transforming growth factor-β*) favorecem o crescimento descontrolado, assim como mutações nas enzimas que produzem certas prostaglandinas (*COX-2*, ciclooxigenase; ver Figura 10-17) ou na enzima 15-PGDH (15-hidroxiprostagandina-desidrogenase). A maioria dos tumores malignos de outros tecidos provavelmente é o resultado de uma série de mutações como estas, embora não necessariamente nesses genes específicos, ou nessa mesma ordem. [Fonte: informações de S. D. Markowitz e M. M. Bertagnolli, *N. Engl. J. Med.* 361:2449, 2009, Fig. 2.]

Quando um pólipó é detectado no estágio de adenoma inicial e as células contendo as primeiras mutações são cirurgicamente removidas, adenomas avançados e carcinomas não se desenvolverão e, por isso, o diagnóstico precoce é importante. As células e os organismos também têm seus sistemas de detecção precoce. Por exemplo, as proteínas ATM e ATR, descritas na Seção 12.10, podem detectar danos no DNA extensos demais para serem reparados com sucesso. Essas proteínas iniciam, então, por uma via que inclui a p53, o processo de apoptose, no qual uma célula que se tornou perigosa para o organismo mata a si mesma.

O desenvolvimento de métodos rápidos e baratos de sequenciamento de DNA abriu uma nova porta para entender como o processo do câncer se desenvolve. Em um estudo típico sobre cânceres humanos, as sequências de 20 mil genes em cerca de 3.300 tumores diferentes foram determinadas e comparadas com as sequências dos genes em tecidos não cancerosos de um mesmo paciente. No total, foram determinadas quase 300 mil mutações. Somente um pequeno número corresponde a **mutações oncogênicas**, isto é, aquelas que são a *causa* de divisão celular

descontrolada. A grande maioria (> 99,9%) foi de “mutações passageiras”, aquelas que ocorrem aleatoriamente e não propiciam vantagem para que os tecidos onde elas ocorrem cresçam mais. Entre estas mutações oncogênicas se incluem mutações em cerca de 75 supressores de tumor e cerca de 65 oncogenes. Estas 140 mutações oncogênicas se enquadram em três categorias gerais: as que afetam a sobrevivência da célula (p. ex., nos genes que codificam para as proteínas Ras, PI3K, MAPK), as que afetam a capacidade da célula de manter o genoma intacto (ATM, ATR) e as que afetam o destino celular, levando a que a célula se divida, se diferencie ou se torne quiescente (p. ex., APC). Um pequeno número de mutações é muito comum em vários tipos de câncer, nos genes da Ras, p53 e pRB, por exemplo. ■

Apoptose é o suicídio celular programado

Muitas células podem controlar precisamente o momento da sua própria morte pelo processo de **morte celular programada**, ou **apoptose** (do termo grego para “queda”, como a queda das folhas no outono). Danos irreparáveis no DNA constituem um dos estímulos para a apoptose. A morte ce-

lular programada também ocorre durante o desenvolvimento embrionário, quando algumas células devem morrer para dar a um tecido ou órgão sua forma final. A modelagem dos dedos a partir do apêndice arredondado dos membros requer a morte precisamente cronometrada das células entre os ossos em desenvolvimento. Durante o desenvolvimento do nematódeo *C. elegans* a partir de um óvulo fecundado, exatamente 131 células (de um total de 1.090 células somáticas embrionárias) devem ser eliminadas por morte celular programada para que o corpo do adulto seja construído.

A apoptose também tem funções em outros processos que não o desenvolvimento. Se uma célula produtora de anticorpos origina anticorpos contra uma proteína ou glicoproteína normalmente presente no organismo, aquela célula é submetida à morte celular programada no timo – mecanismo essencial para a eliminação de autoanticorpos (a causa de muitas doenças autoimunes). A descamação mensal da parede do útero (menstruação) é outro exemplo da mediação da morte celular normal por apoptose. A queda das folhas no outono é o resultado da apoptose de células específicas do caule. Algumas vezes, o suicídio celular não é programado, mas ocorre em resposta a circunstâncias biológicas que ameaçam o resto do organismo. Por exemplo, uma célula infectada por vírus que morre antes de completar o ciclo de infecção viral restringe a disseminação do vírus para as células próximas. Alguns tipos de estresse, como calor, hiperosmolaridade, luz UV e radiação gama, também provocam o suicídio celular; supostamente, o organismo estará melhor se quaisquer células aberrantes, potencialmente mutadas, forem mortas.

Os mecanismos de regulação que iniciam a apoptose envolvem algumas das mesmas proteínas que regulam o ciclo celular. O sinal para o suicídio com frequência chega do exterior, por meio de um receptor da superfície celular. O fator de necrose tumoral (TNF, do inglês, *tumor necrosis factor*), produzido pelas células do sistema imune, interage com as células por meio de receptores específicos para TNF. Esses receptores têm sítios de ligação para TNF na superfície externa da membrana plasmática e um “domínio da morte” (~ 80 resíduos de aminoácidos) que carrega o sinal de autodestruição pelo qual o sinal atravessa a membrana até proteínas citosólicas, como TRADD (receptor de TNF associado ao domínio da morte) (Figura 12-40).

Quando a caspase 8, uma caspase “iniciadora”, é ativada por um sinal apoptótico transmitido pelo FADD, ela amplifica sua ativação pela clivagem de sua própria forma de pró-enzima. As mitocôndrias são um dos alvos da caspase 8 ativada. A protease provoca a liberação de certas proteínas que são mantidas entre as membranas interna e externa da mitocôndria: citocromo *c* e várias “caspases efetoras” (ver Figura 19-39). O citocromo *c* liga-se à forma pró-enzima da enzima efetora caspase 9 e estimula a sua ativação por proteólise. A caspase 9 ativada, por sua vez, catalisa a destruição em larga escala de proteínas celulares – uma das principais causas da morte celular apoptótica. Um alvo específico da ação das caspases é uma desoxirribonuclease ativada por caspase.

Na apoptose, os produtos monoméricos da degradação de proteínas e DNA (aminoácidos e nucleotídeos) são liberados por um processo controlado que permite que eles sejam captados e reutilizados pelas células vizinhas. A apopto-

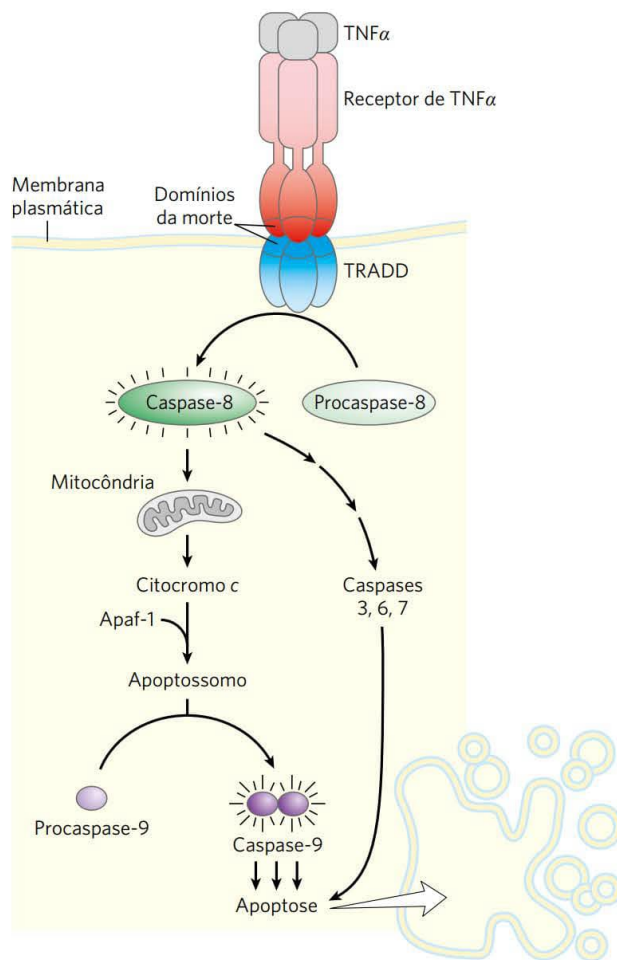


FIGURA 12-40 Os eventos iniciais da apoptose. Um sinal de fora da célula (TNFα) dispara a apoptose ao se ligar a um receptor específico na membrana plasmática. O receptor ocupado interage com a proteína citosólica TRADD por meio dos “domínios da morte” (domínio de 80 resíduos de aminoácidos presente tanto no receptor de TNFα como no TRADD), ativando TRADD. O TRADD ativado inicia a cascata de enzimas proteolíticas que leva à apoptose: TRADD ativa a caspase 8, que atua liberando citocromo *c* da mitocôndria, o qual, em conjunto com a proteína Apaf-1, ativa a caspase 9, disparando a apoptose (ver Figura 19-39).

se, portanto, possibilita que o organismo elimine uma célula desnecessária, ou potencialmente perigosa, sem desperdiçar seus componentes.

RESUMO 12.11 Oncogenes, genes supressores de tumor e morte celular programada

- Os oncogenes codificam proteínas de sinalização defeituosas. Pela emissão contínua do sinal para a divisão celular, elas levam à formação de tumores. Os oncogenes são geneticamente dominantes e podem codificar fatores de crescimento, receptores, proteínas G, proteínas-cinase ou reguladores nucleares da transcrição defeituosos.
- Os genes supressores de tumor codificam proteínas reguladoras que normalmente inibem a divisão celular; mutações nesses genes são geneticamente recessivas, mas podem levar à formação de tumores.

- O câncer geralmente é o resultado de um acúmulo de mutações em oncogenes e genes supressores de tumor.
- Quando genes de estabilidade, que codificam proteínas necessárias para o reparo de danos genéticos, são mutados, outras mutações ficam sem reparo, incluindo mutações em proto-oncogenes e genes supressores de tumor que podem levar ao câncer.
- A apoptose é a morte celular programada e controlada que ocorre normalmente durante o desenvolvimento e a vida adulta para livrar o organismo de células desnecessárias, danificadas ou infectadas. A apoptose pode ser iniciada por sinais extracelulares, como o TNF, que agem por meio de receptores da membrana plasmática.

Termos-chave

Termos em negrito estão definidos no glossário.

- transdução de sinal** 437
especificidade 437
cooperatividade 438
 amplificação 438
cascata enzimática 438
 modularidade 438
estruturas 438
dessensibilização 439
 integração 439
 localização da resposta 439
receptores acoplados a proteína G (GPCRs) 440
proteínas que ligam nucleotídeos de guanosina 440
proteínas G 440
segundo mensageiro 440
agonista 441
antagonista 441
 receptores
 β-adrenérgicos 441
 receptores hepta-helicoidais 441
proteína G estimuladora (G_s) 441
 adenilil-ciclase 441
 proteína-cinase dependente de cAMP (proteína-cinase A; PKA) 442
 alça P 444
proteína ativadora de GTPases (GAP) 445
regulador da sinalização por proteínas G (RGS) 445
fator de troca de nucleotídeo de guanosina (GEF) 445
- sequência-consenso** 446
 β-arrestina (βarr; arrestina 2) 449
cinases dos receptores associados a proteínas G (GRK) 449
 proteína de ligação do elemento de resposta a cAMP (CREB) 450
proteína G inibitória (G_i) 450
proteínas adaptadoras 450
 AKAP (proteínas de ancoragem da cinase A) 450
 fosfolipase C 451
 inositol-1,4,5-trisfosfato (IP₃) 451
 proteína-cinase C 451
proteína fluorescente verde (GFP) 452
transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET) 452
 calmodulina (CaM) 454
 proteínas-cinase dependentes de Ca²⁺/proteínas-cinase dependentes de calmodulina (CaM-cinase) 454
rodopsina 456
opsina 456
 rodopsina-cinase 457
 potencial do receptor 459
 gustaducina 459
receptor tirosina-cinase (RTK) 461
autofosforilação 461

- domínio SH2** 461
Ras 461
proteínas G pequenas 461
 MAPK 462
 3',5'-guanosina-monofosfato cíclico (GMP cíclico; cGMP) 466
 proteína-cinase dependente de cGMP (proteína-cinase G; PKG) 466
 fator natriurético atrial (ANF) 466
 NO-sintase 467
 domínios PTB 468
 canais iônicos dependentes de voltagem 472
ionotrópico 473
metabotrópico 473
elemento de resposta a hormônios (HRE) 474

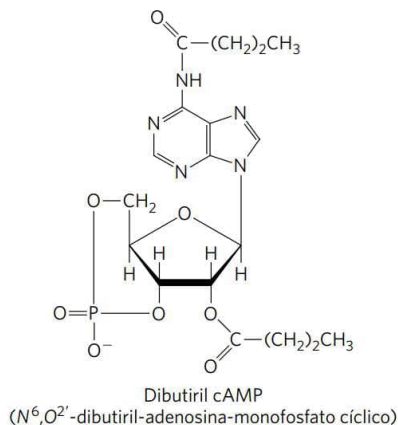
- sistemas binários** 475
 receptor histidina-cinase 475
 regulador da resposta 475
ciclina 477
 proteína-cinase dependente de ciclina (CDK) 477
ubiquitina 478
proteassomo 478
fatores de crescimento 478
 proteína do retinoblastoma (pRb) 480
oncogene 481
proto-oncogene 481
genes supressores de tumor 484
 morte celular programada 485
apoptose 485

Teste seu conhecimento

1. Experimentos com hormônios em sistemas livres de células Na década de 1950, Earl W. Sutherland, Jr. e colaboradores conduziram experimentos pioneiros para a elucidação do mecanismo de ação da adrenalina e do glucagon. Com base no que foi discutido neste capítulo sobre a ação hormonal, interprete cada um dos experimentos descritos a seguir. Identifique a substância X e comente a importância dos resultados.

- (a) A adição de adrenalina a um homogeneizado de fígado normal resultou em um aumento na atividade da glicogênio-fosforilase. Entretanto, quando o homogeneizado foi primeiramente centrifugado em alta rotação e a adrenalina ou o glucagon foram adicionados à fração sobrenadante que continha a fosforilase, não ocorreu nenhum aumento na atividade da fosforilase.
- (b) Quando a fração particulada da centrifugação em (a) foi tratada com adrenalina, a substância X foi produzida. A substância foi isolada e purificada. Ao contrário da adrenalina, a substância X ativou a glicogênio-fosforilase quando adicionada à fração sobrenadante do homogeneizado centrifugado.
- (c) A substância X era termoestável; isto é, o tratamento com calor não afetou sua capacidade de ativar a fosforilase. (Dica: seria este o caso se a substância X fosse uma proteína?) A substância X era praticamente idêntica a um composto obtido quando ATP puro era tratado com hidróxido de bário. (A Figura 8-6 será útil.)

2. A ação de dibutilil-cAMP versus cAMP em células intactas A ação fisiológica da adrenalina deveria, em princípio, ser mimetizada pela adição de cAMP às células-alvo. Na prática, a adição de cAMP a células-alvo intactas provoca apenas uma resposta fisiológica mínima. Por quê? Quando o derivado estruturalmente relacionado dibutilil-cAMP (mostrado a seguir) é adicionado às células intactas, a resposta fisiológica esperada aparece prontamente. Explique a base das diferenças das respostas celulares a essas duas substâncias. O dibutilil-cAMP é amplamente utilizado nos estudos sobre a função do cAMP.



3. Efeito da toxina do cólera sobre a adenilil-ciclase

A bactéria gram-negativa *Vibrio cholerae* produz uma proteína, a toxina do cólera (M_r 90.000), responsável pelos sintomas característicos do cólera: extensa perda de água e Na^+ corporais devido à diarreia contínua e debilitante. Caso os fluidos corporais e o Na^+ não sejam repostos, a doença leva à desidratação grave e, quando não tratada, frequentemente é fatal. Quando a toxina do cólera ganha acesso ao trato intestinal humano, ela liga-se fortemente a sítios específicos da membrana plasmática das células epiteliais que revestem o intestino delgado, levando à ativação prolongada (por horas ou dias) da adenilil-ciclase.

- Qual é o efeito da toxina do cólera sobre a [cAMP] das células intestinais?
- Com base nas acima informações, sugira como o cAMP atua normalmente nas células do epitélio intestinal.
- Sugira um possível tratamento para o cólera.

4. Mutações na PKA Explique como mutações nas subunidades R ou C da proteína-cinase dependente de cAMP (PKA) poderiam levar a (a) uma PKA permanentemente ativa ou (b) uma PKA permanentemente inativa.



5. O efeito terapêutico do albuterol Os sintomas respiratórios da asma são resultantes da constrição dos brônquios e bronquíolos dos pulmões, causada pela contração do músculo liso de suas paredes. Esta constrição pode ser revertida pelo aumento da [cAMP] no músculo liso. Explique o efeito terapêutico do albuterol, um agonista β -adrenérgico administrado (por inalação) para asma. Você esperaria alguns efeitos colaterais para este fármaco? Se esse for o caso, como seria possível planejar fármacos melhores que não tenham esses efeitos?

6. Término da sinalização hormonal Os sinais transmitidos por hormônios devem, ao final, ser encerrados. Descreva alguns mecanismos diferentes para o término da sinalização.

7. Utilizando FRET para explorar as interações proteína-proteína *in vivo* A Figura 12-8 mostra a interação entre β -arrestina e o receptor β -adrenérgico. Como você utilizaria a técnica FRET (ver Quadro 12-2) para demonstrar essa interação em células vivas? Quais proteínas você fusionaria? Quais comprimentos de onda você utilizaria para iluminar as células, e quais seriam utilizados para o monitoramento? O que você esperaria observar caso a interação ocorresse? E caso não ocorresse? Como você poderia explicar a falha dessa abordagem para demonstrar essa interação?

8. Injeção de EGTA EGTA (ácido etilenoglicol-bis(β -aminoetiléter)- N,N,N',N' -tetracético) é um agente quelante com alta afinidade e especificidade por Ca^{2+} . Pela microinjeção de uma célula com uma solução apropriada de Ca^{2+} -EGTA, um pesquisador pode impedir que a $[Ca^{2+}]$ citosólica aumente acima de 10^{-7} M. Como a microinjeção de EGTA afetaria a resposta celular ao hormônio antidiurético (ver Tabela 12-4)? E como afetaria a resposta ao glucagon?

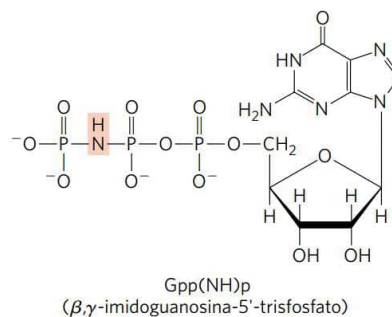
9. Amplificação dos sinais hormonais Descreva todas as fontes de amplificação do sistema do receptor de insulina.

10. Mutações no gene *ras* Como uma mutação no *ras* que leve à síntese de uma proteína Ras sem atividade GTPásica afetaria a resposta celular à insulina?

11. Diferenças entre proteínas G Compare a proteína G_s , que age como transdutora de sinal de receptores β -adrenérgicos com a proteína G_{i1} Ras. Que propriedades elas têm em comum? Em que são diferentes? Qual é a diferença funcional entre G_s e G_{i1} ?

12. Os mecanismos de regulação das proteínas-cinase Identifique oito tipos gerais de proteínas-cinase encontradas em células eucarióticas e explique que fator é diretamente responsável pela ativação de cada tipo.

13. Análogos não hidrolisáveis do GTP Muitas enzimas podem hidrolisar GTP entre os fosfatos β e γ . O análogo de GTP β,γ -imidoguanosina-5'-trifosfato (Gpp(NH)p), mostrado a seguir, não pode ser hidrolisado entre os fosfatos β e γ .



Prediga o efeito sobre a resposta celular ao estímulo β -adrenérgico da microinjeção de Gpp(NH)p em um miócito.

14. O uso da ligação de uma toxina para a purificação de uma proteína de canal A α -bungarotoxina é uma neurotoxina muito potente encontrada no veneno de uma serpente venenosa (*Bungarus multicinctus*). Ela se liga ao receptor de acetilcolina (AChR, uma proteína integral da membrana plasmática) com alta especificidade e impede a abertura de canais. Essa interação foi utilizada para a purificação do AChR a partir do órgão elétrico do peixe-elétrico.

- Esboce uma estratégia para o uso de α -bungarotoxina covalentemente ligada a uma resina cromatográfica para a purificação da proteína AChR. (Dica: ver Figura 3-17c.)
- Esboce uma estratégia para o uso de $[^{125}I]\alpha$ -bungarotoxina para a purificação da proteína AChR.

15. A excitação provocada pela hiperpolarização Na maioria dos neurônios, a *despolarização* da membrana leva à abertura de canais iônicos dependentes de voltagem, à geração de um potencial de ação e, finalmente, ao influxo de Ca^{2+} , que

causa a liberação do neurotransmissor na extremidade terminal do axônio. Formule uma estratégia celular pela qual a *hiperpotarização* nos bastonetes poderia produzir a excitação da rota de transdução da visão e a passagem do sinal visual ao cérebro. (Dica: a via de sinalização dos neurônios nos organismos superiores consiste em uma *série* de neurônios que transmitem a informação para o cérebro. O sinal liberado por um neurônio para o neurônio seguinte, pós-sináptico, pode ser tanto excitatório quanto inibitório.)



16. A dessensibilização da visão

A doença de Oguchi é uma forma hereditária de cegueira noturna. Os indivíduos afetados demoram a recuperar a visão após um clarão de luz brilhante contra um fundo escuro, como os faróis de um carro em uma autoestrada. Sugira qual(is) defeito(s) molecular(es) pode(m) estar envolvido(s) na doença de Oguchi. Explique, em termos moleculares, como esse defeito seria responsável pela cegueira noturna.

17. Efeito de um análogo de cGMP ao qual os bastonetes são permeáveis Um análogo do cGMP, 8-Br-cGMP, permeável às membranas celulares, é degradado lentamente pela atividade da PDE de um bastonete, sendo tão eficaz quanto o cGMP para a abertura do canal iônico do segmento externo da célula. Se você preparar uma suspensão de bastonetes em um tampão contendo uma [8-Br-cGMP] relativamente alta e então iluminar as células enquanto mede o potencial de membrana, o que você observaria?

18. As sensações de quente e frio na gustação As sensações de quente e frio são transduzidas por um grupo de canais iônicos dependentes de temperatura. Por exemplo, TRPV1, TRPV3 e TRPM8 estão normalmente fechados, mas se abrem sob as seguintes condições: TRPV1 a $\geq 43^\circ\text{C}$, TRPV3 a $\geq 33^\circ\text{C}$ e TRPM8 a $< 25^\circ\text{C}$. Essas proteínas-canais são expressas em neurônios sensoriais que, sabidamente, respondem à sensação da temperatura.

- Proponha um modelo razoável para explicar como a exposição de um neurônio sensorial contendo TRPV1 a uma alta temperatura leva a uma sensação de calor.
- A capsaicina, um dos ingredientes ativos das pimentas “quentes”, é um agonista de TRPV1. A capsaicina, na concentração de 32 nM aumenta a resposta da TRPV1 em 50%, uma grandeza conhecida como EC_{50} . Explique por que poucas gotas de um molho apimentado podem dar a sensação de muito “quente”, sem, de fato, queimar.
- O mentol, um dos componentes ativos da menta é agonista de TRPM8 ($EC_{50} = 30 \mu\text{M}$) e TRPV3 ($EC_{50} = 20 \text{ mM}$). Que sensação você esperaria do contato com baixos níveis de mentol? E com altos níveis?



19. Oncogenes, genes supressores de tumor e tumores

Apresente, para as seguintes situações, uma explicação plausível de como elas poderiam levar à divisão celular irrestrita.

- As células do câncer de colo frequentemente contêm mutações no gene que codifica o receptor de prostaglandina E_2 . A PGE_2 é um fator de crescimento requerido para a divisão das células do trato gastrointestinal.
- O sarcoma de Kaposi, tumor comum em pessoas com Aids não tratada, é causado por um vírus portador de um gene para uma proteína semelhante aos receptores de quimiocinas CXCR1 e CXCR2. As quimiocinas são fatores de crescimento célula-específicos.

- Adenovírus, um vírus tumoral, porta um gene para a proteína E1A, que se liga à proteína do retinoblastoma, pRb. (Dica: ver Figura 12-37.)
- Uma característica importante de muitos oncogenes e genes supressores tumorais é a especificidade ao tipo celular. Por exemplo, mutações no receptor de PGE_2 não são encontradas em tumores de pulmão. Explique essa observação. (Lembre-se de que a PGE_2 age por meio de um GPCR da membrana plasmática.)

20. Mutações em genes supressores de tumor e oncogenes Explique por que mutações em genes supressores de tumor são recessivas (ambas as cópias do gene devem estar defeituosas para que a regulação da divisão celular seja defeituosa), ao passo que mutações em oncogenes são dominantes.



21. Retinoblastoma em crianças Explique por que algumas crianças com retinoblastoma desenvolvem múltiplos tumores da retina em ambos os olhos, ao passo que outras apresentam um único tumor em um único olho.

22. A especificidade de um sinal para um único tipo celular Discuta a validade da seguinte proposição. Uma molécula sinalizadora (hormônio, fator de crescimento ou neurotransmissor) induz respostas idênticas em diferentes tipos de células-alvo se elas contiverem receptores idênticos.

Problema de análise de dados

23. Explorando a sensação da gustação em camundongos Sabores agradáveis são uma adaptação evolutiva para encorajar os animais a consumirem alimentos nutritivos. Zhao e colaboradores (2003) examinaram as duas principais sensações prazerosas da gustação: doce e umami. O umami, “distinto sabor salgado” induzido por aminoácidos (sobretudo aspartato e glutamato) provavelmente estimula os animais a consumirem alimentos ricos em proteína. O glutamato monossódico (MSG, do inglês, *monosodium glutamate*) é um acentuador de sabor que explora essa sensibilidade.

Na época em que o artigo foi publicado, estava-se tentando caracterizar proteínas receptoras de sabor doce e umami. Três dessas proteínas eram conhecidas – T1R1, T1R2 e T1R3, as quais atuavam como complexos receptores heterodiméricos. T1R1-T1R3 foi preliminarmente identificado como o receptor para umami, e T1R2-T1R3 como o receptor para doce. Não estava claro como a sensação da gustação era codificada e enviada ao cérebro, e dois modelos possíveis foram sugeridos. No modelo com base nas células, cada uma das células sensoriais de sabor expressa apenas um tipo de receptor; isto é, existem “células doces”, “células amargas”, “células umami”, e assim por diante, e cada tipo celular envia sua informação ao cérebro via um nervo diferente. O cérebro “sabe” qual sabor é detectado pela identidade da fibra nervosa que transmite a mensagem. No modelo com base no receptor, cada célula sensorial de sabor expressa diferentes tipos de receptores e envia diferentes mensagens ao longo da mesma fibra nervosa ao cérebro, e a mensagem é dependente de qual receptor é ativado. Também não estava claro naquela época se havia alguma interação entre as diferentes sensações da gustação, ou se partes de um sistema sensorial da gustação eram necessárias para as outras sensações do desse sentido.

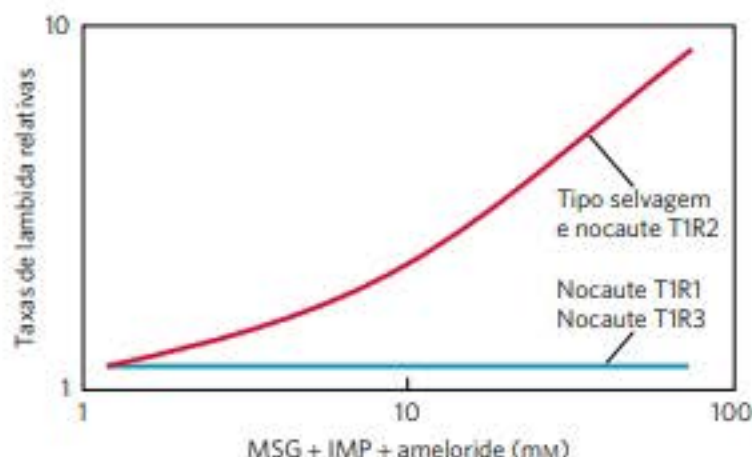
- Trabalhos anteriores haviam mostrado que diferentes receptores proteicos de sabor são expressos em conjun-

tos não sobrepostos de células receptoras de sabor. Que modelo estes trabalhos apoiam? Explique o raciocínio utilizado.

Zhao e colaboradores construíram um grupo de “camundongos nocaute” – camundongos homozigotos para os alelos de perda de função para um dos três receptores proteicos, T1R1, T1R2 ou T1R3 – e camundongos duplo-nocaute com T1R2 e T1R3 não funcionais. Os pesquisadores mediram a percepção do sabor nesses camundongos por meio da medida da “taxa de consumo” de soluções contendo moléculas de sabores diferentes. Os camundongos lambeiram o bico de uma mamadeira com solução de sabor agradável mais frequentemente do que o de uma com solução de sabor desagradável. Os pesquisadores mediram taxas de consumo relativas: quão frequentemente os camundongos lambeiram uma solução de amostra em comparação com a água. Um índice de lambida relativa igual a 1 indica sem preferência; < 1 , uma aversão; e > 1 , uma preferência.

- (b) Todas as quatro linhagens de camundongos nocaute apresentaram as mesmas respostas que os camundongos do tipo selvagem aos sabores salgado e amargo. Quais das questões acima foram analisadas neste experimento? O que você conclui a partir desses resultados?

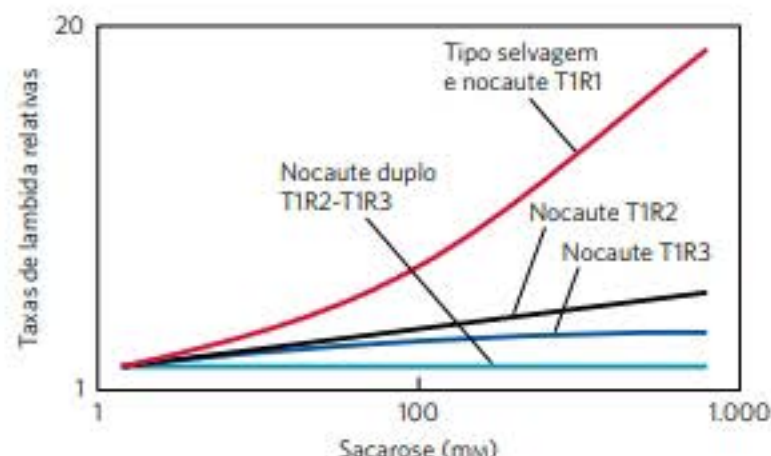
Os pesquisadores, então, estudaram a recepção do sabor umami pela medida das taxas de consumo de diferentes quantidades de MSG na solução de alimentação entre as diferentes linhagens de camundongo. Observe que as soluções também continham monofosfato de inosina (IMP), um potente intensificador da recepção do sabor umami (e um ingrediente comum do macarrão instantâneo tipo lámen, juntamente com o MSG), e amelorida, que suprime o sabor salgado agradável conferido pelo sódio do MSG. Os resultados estão mostrados no gráfico.



- (c) Esses resultados são consistentes com o receptor do sabor umami compreendendo um heterodímero de T1R1 e T1R3? Sim ou não? Por quê?

- (d) Que modelo da codificação dos sabores esses resultados apoiam? Explique o raciocínio utilizado.

Zhao e colaboradores, então, conduziram uma série de experimentos similares utilizando a sacarose como sabor doce. Os resultados são mostrados a seguir.



- (e) Esses dados são consistentes com o receptor do sabor doce compreendendo um heterodímero de T1R2 e T1R3? Sim ou não? Por quê?
- (f) Houve algumas respostas inesperadas em concentrações de glicose muito altas. Como essas respostas dificultam a ideia de um sistema heterodimérico como o apresentado anteriormente?

Além dos açúcares, os seres humanos também sentem outros compostos (p. ex., os peptídeos monelina e aspartame) como doces; os camundongos não sentem esses peptídeos como doces. Zhao e colaboradores inseriram no genoma do camundongo nocaute para T1R2 uma cópia do gene de T1R2 humano sob o controle do promotor do T1R2 do camundongo. Esses camundongos modificados agora sentiam monelina e sacarina como doces. Os pesquisadores foram além, inserindo nos camundongos nocaute para T1R1 a proteína RASSL – receptor ligado à proteína G para o opioide sintético espiradolina; o gene da RASSL estava sob o controle de um promotor que poderia ser induzido pela administração de tetraciclina aos camundongos. Esses camundongos não tinham preferência por espiradolina na ausência de tetraciclina; na presença de desta, mostravam uma forte preferência por concentrações nanomolares de espiradolina.

- (g) Esses resultados reforçam as conclusões sobre o mecanismo de sensação ao sabor?

Referência

Zhao, G.Q., Y. Zhang, M.A. Hoon, J. Chandrashekar, I. Erlenbach, N.J.P. Ryba e C. Zuker. 2003. The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell* 115:255–266.

Bioenergética e metabolismo

- 13 Bioenergética e metabolismo 495
- 14 Glicólise, gliconeogênese e a via das pentoses-fosfato 533
- 15 Princípios da regulação metabólica 575
- 16 O ciclo do ácido cítrico 619
- 17 Catabolismo de ácidos graxos 649
- 18 Oxidação de aminoácidos e produção de ureia 675
- 19 Fosforilação oxidativa 711
- 20 Fotofosforilação e biossíntese de carboidratos em plantas e bactérias 755
- 21 Biossíntese de lipídeos 811
- 22 Biossíntese de aminoácidos, nucleotídeos e moléculas relacionadas 859
- 23 Regulação hormonal e integração do organismo de mamíferos 907

Metabolismo é uma atividade celular altamente coordenada na qual muitos sistemas multienzimáticos (vias metabólicas) cooperam para (1) obter energia química pela captura da energia solar ou pela degradação de nutrientes ricos em energia obtidos do ambiente; (2) converter as moléculas dos nutrientes em moléculas próprias e características da célula, inclusive precursores de macromoléculas; (3) polimerizar os precursores monoméricos em macromoléculas: proteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos; e (4) sintetizar e degradar as biomoléculas necessárias para funções celulares especializadas, como lipídeos de membrana, mensageiros intracelulares e pigmentos.

Embora o metabolismo abranja muitas centenas de reações diferentes catalisadas por enzimas, a principal preocupação da Parte II se concentra nas vias metabólicas centrais que estão em menor número e são impressionantemente similares em todas as formas de vida. Os seres vivos podem ser divididos em dois grandes grupos, de acordo com a forma química pela qual obtêm carbono do meio ambiente. Os organismos **autotróficos** (como bactérias fotossintéticas, algas verdes e plantas vasculares) podem usar dióxido de carbono da atmosfera como única fonte de carbono, a

partir do qual formam todas as suas moléculas que contêm carbono (ver Figura 1-6). Os organismos **heterotróficos** não podem usar o dióxido de carbono da atmosfera e devem obter carbono do meio ambiente na forma de moléculas orgânicas relativamente complexas, como a glicose. Os animais multicelulares e a maioria dos microrganismos são heterotróficos. As células e os organismos autotróficos são relativamente autossuficientes, ao passo que as células e os organismos heterotróficos, devido à necessidade de carbono em formas mais complexas, sobrevivem apenas à custa dos produtos de outros organismos.

Muitos organismos autotróficos são fotossintéticos e obtêm energia da luz solar, ao passo que os organismos heterotróficos obtêm energia pela degradação de nutrientes orgânicos produzidos por organismos autotróficos. Na nossa biosfera, os organismos autotróficos e heterotróficos vivem juntos em um vasto ciclo interdependente, no qual os organismos autotróficos usam o dióxido de carbono da atmosfera para formarem suas biomoléculas orgânicas, algumas das quais produzem oxigênio a partir de água no decorrer desses processos. Os organismos heterotróficos, por sua vez, usam os produtos orgânicos dos organismos autotróficos como nutrientes e devolvem dióxido de carbono para a atmosfera. Algumas das reações de oxidação que produzem dióxido de carbono também consomem oxigênio, convertendo-o em água. Assim, carbono, oxigênio e água são reciclados constantemente entre os mundos heterotrófico e autotrófico, e a energia solar é a força motriz desse processo global (**Figura 1**).

Todos os seres vivos também necessitam de nitrogênio, o qual é necessário para a síntese de aminoácidos, nucleotídeos e outros compostos. As bactérias e as plantas geralmente podem usar tanto amônia quanto nitrato como única fonte de nitrogênio, mas os vertebrados devem obter nitrogênio na forma de aminoácidos e outros compostos orgânicos. Apenas poucos organismos, cianobactérias e várias espécies de bactérias do solo que vivem em simbiose com as raízes de determinadas plantas são capazes de converter (“fixar”) o nitrogênio atmosférico (N_2) em amônia. Outras bactérias (bactérias nitrificadoras) oxidam amônia em nitritos e nitratos, e outras, ainda, convertem nitrato

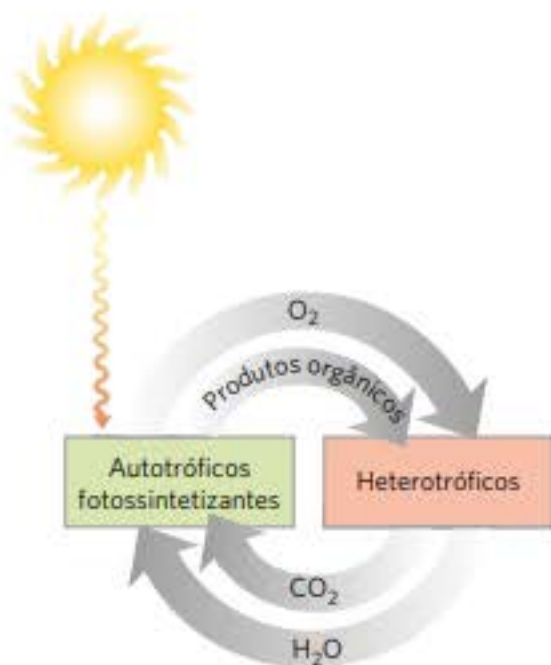


FIGURA 1 Ciclo do dióxido de carbono e do oxigênio entre os campos autotrófico (fotossintético) e heterotrófico da biosfera. O fluxo de massa por esse ciclo é enorme; cerca de 4×10^{11} toneladas de carbono são recicladas anualmente na biosfera.

em N_2 . Bactérias anamox convertem amônia e nitrito em N_2 . Assim, além dos ciclos globais do carbono e do oxigênio, um ciclo de nitrogênio também ocorre na biosfera, reciclando quantidades enormes de nitrogênio (**Figura 2**). Os ciclos do carbono, oxigênio e nitrogênio, que, no fim, envolvem todas as espécies, dependem de que na nossa biosfera haja um balanço apropriado entre as atividades dos organismos produtores (autotróficos) e dos consumidores (heterotróficos).

Esses ciclos de matéria são possíveis graças a um enorme fluxo de energia para e através da biosfera que se inicia pela captura de energia solar pelos organismos fotossintéticos e o uso dessa energia para formar carboidratos e outros nutrientes orgânicos ricos em energia. Esses nutrientes são, então, utilizados como fonte de energia pelos organismos heterotróficos. Nos processos metabólicos e em todas as transformações de energia, há uma perda de energia útil (energia livre) e aumento inevitável na quantidade de energia não aproveitável (calor e entropia). Ao contrário do ciclo de matéria, a energia flui na biosfera em apenas um sentido, os organismos não podem regenerar energia a partir de calor e entropia dissipados. Carbono, oxigênio e nitrogênio são reciclados continuamente, porém a energia é constantemente transformada em formas não aproveitáveis, como calor.

O **metabolismo**, a soma de todas as transformações que ocorrem em uma célula ou organismo, dá-se por meio de uma série de reações catalisadas por enzimas que formam as **vias metabólicas**. Cada uma das etapas consecutivas de uma via metabólica contribui com uma mudança química pequena e específica – normalmente remoção, transferência ou adição de um determinado átomo ou grupo funcional. O precursor é convertido em produto por meio de uma série

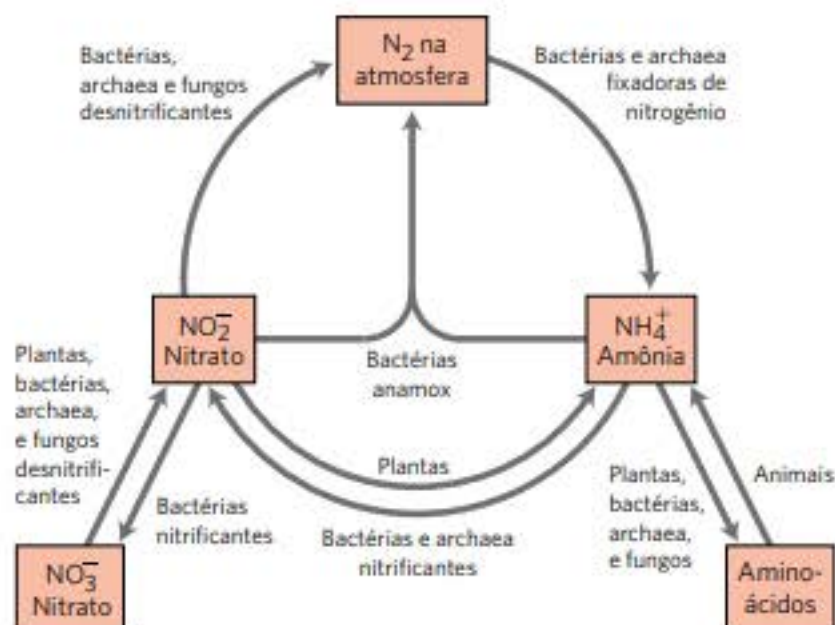


FIGURA 2 Ciclo do nitrogênio na biosfera. O nitrogênio gasoso (N_2) corresponde a mais de 80% da atmosfera terrestre.

de intermediários metabólicos, denominados **metabólitos**. Em geral, o termo **metabolismo intermediário** é aplicado para a atividade combinada de todas as vias metabólicas que interconvertem precursores, metabólitos e produtos de baixo peso molecular (em geral, $M_r < 1.000$).

O **catabolismo** é a fase degradativa do metabolismo, onde as moléculas de nutrientes orgânicos (carboidratos, gorduras e proteínas) são convertidas em produtos finais mais simples (como ácido láctico, CO_2 e NH_3). As vias catabólicas liberam energia, parte da qual é conservada na formação de ATP e carreadores de elétrons reduzidos (NADH, NADPH e $FADH_2$), sendo que o resto é perdido como calor. No **anabolismo**, também chamado de biossíntese, precursores simples pequenos são utilizados para formar moléculas maiores e mais complexas, incluindo lipídeos, polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos. As reações anabólicas necessitam de um suprimento de energia na forma de potencial de transferência de grupos fosforila do ATP e do poder redutor de NADH, NADPH e $FADH_2$ (**Figura 3**).

Algumas vias metabólicas são lineares e outras são ramificadas, produzindo muitos produtos finais úteis a partir de um único precursor ou convertendo vários materiais de partida em um único produto. De maneira geral, as vias catabólicas são *convergentes* e as vias anabólicas *divergentes* (**Figura 4**). Algumas vias são cíclicas: um dos componentes que iniciam a via é regenerado na série de reações que convertem o outro componente que inicia a via em outro produto. Nos próximos capítulos, serão examinados exemplos de cada um desses tipos de vias metabólicas.

A maioria das células possui enzimas que processam tanto a degradação quanto a síntese de categorias importantes de biomoléculas (p. ex., ácidos graxos). A síntese e a degradação simultânea de ácidos graxos seria um desperdício, mas isso é evitado pela regulação recíproca das sequências de reações anabólicas e catabólicas, de modo que, quando uma está operante, a outra está inoperante.

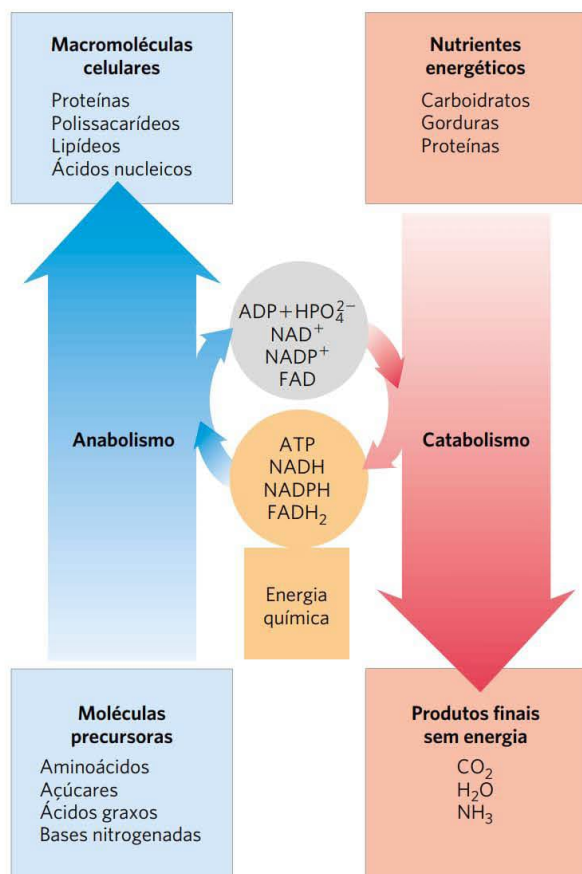


FIGURA 3 O quadro geral: relações energéticas entre as vias catabólicas e anabólicas. As vias catabólicas disponibilizam energia química na forma de ATP, NADH, NADPH e FADH_2 . Esses transportadores de energia são usados em vias anabólicas para converter precursores pequenos em macromoléculas celulares.

Essas regulações não poderiam ocorrer caso as vias anabólicas e catabólicas fossem catalisadas por exatamente o mesmo conjunto de enzimas, um operando na direção do anabolismo e o outro operando na direção oposta (catabolismo), pois a inibição de uma enzima envolvida no catabolismo também inibiria a sequência de reações na direção do anabolismo. As vias anabólicas e catabólicas que estão ligadas pelos mesmos dois produtos finais (p. ex., glicose \rightarrow \rightarrow piruvato e piruvato \rightarrow \rightarrow glicose) podem utilizar muitas enzimas iguais, porém, invariavelmente, ao menos uma das etapas é catalisada por enzimas diferentes, uma na direção do anabolismo e outra na direção do catabolismo, e, ainda, essas enzimas constituem pontos de regulações separados. Além disso, para que ambas as vias sejam essencialmente irreversíveis, as reações que são específicas de cada direção devem incluir ao menos uma que seja muito favorável termodinamicamente – em outras palavras, uma reação na qual a reação inversa seja desfavorável. Outro fator que contribui para a regulação separada das sequências de reações anabólicas e catabólicas é a separação do par de vias anabólicas e catabólicas em diferentes comparti-

mentos celulares. Por exemplo, nos animais, o catabolismo dos ácidos graxos ocorre na mitocôndria, e a síntese, no citosol. As concentrações dos intermediários, enzimas e reguladores podem ser mantidas em níveis diferentes nesses diferentes compartimentos. Como as vias metabólicas estão sujeitas ao controle cinético pela concentração do substrato, concentrações diferentes de intermediários anabólicos e catabólicos também contribuem para o controle das velocidades do metabolismo. Sistemas que separam processos anabólicos e processos catabólicos serão discutidos com interesse redobrado.

As vias metabólicas são reguladas em vários níveis, tanto de dentro da célula como de fora dela. A regulação mais imediata é a disponibilidade de substrato; quando as concentrações intracelulares do substrato de uma enzima estiverem próximas ou menores do que a K_m (como geralmente é o caso), a velocidade da reação dependerá fortemente da concentração do substrato (ver Figura 6-11). Um segundo tipo de controle rápido é a regulação alostérica (p. 225) por um intermediário metabólico ou uma coenzima – um aminoácido ou ATP, por exemplo – que sinalize o estado metabólico interno da célula. Quando a célula contém uma quantidade de aspartato, por exemplo, suficiente para as suas necessidades imediatas, ou quando os níveis celulares de ATP indicam que, neste momento, não é mais necessário consumir energia, esses sinais alostéricos inibem a atividade de uma ou mais enzimas de vias metabólicas relevantes. Nos organismos multicelulares, as atividades metabólicas dos diversos tecidos são reguladas e integradas por fatores de crescimento e hormônios que agem de fora da célula. Em certos casos, essa regulação ocorre quase instantaneamente (algumas vezes em menos do que um milissegundo) por meio de alterações nos níveis de mensageiros intracelulares que modificam a atividade de moléculas de enzimas existentes por mecanismos alostéricos ou modificações covalentes, como a fosforilação. Em outros casos, sinais extracelulares modificam a concentração intracelular de uma enzima, alterando a velocidade de síntese ou de degradação de alguma molécula, e, então, os efeitos aparecem apenas depois de minutos ou horas.

A discussão da Parte II inicia com os princípios de energia básicos que governam todo o metabolismo (Capítulo 13). Depois, serão tratadas as principais vias catabólicas pelas quais as células obtêm energia pela oxidação de vários combustíveis (Capítulos 14 a 20). Os Capítulos 19 e 20 representam um ponto central da discussão sobre o metabolismo. Eles dizem respeito ao acoplamento quimiosmótico de energia, um mecanismo universal pelo qual o potencial eletroquímico transmembrana produzido pela oxidação de substratos ou pela absorção de luz impulsiona a síntese de ATP.

Os Capítulos 20, 21 e 22 descrevem as principais vias anabólicas pelas quais as células usam a energia contida no ATP para produzirem carboidratos, lipídeos, aminoácidos e

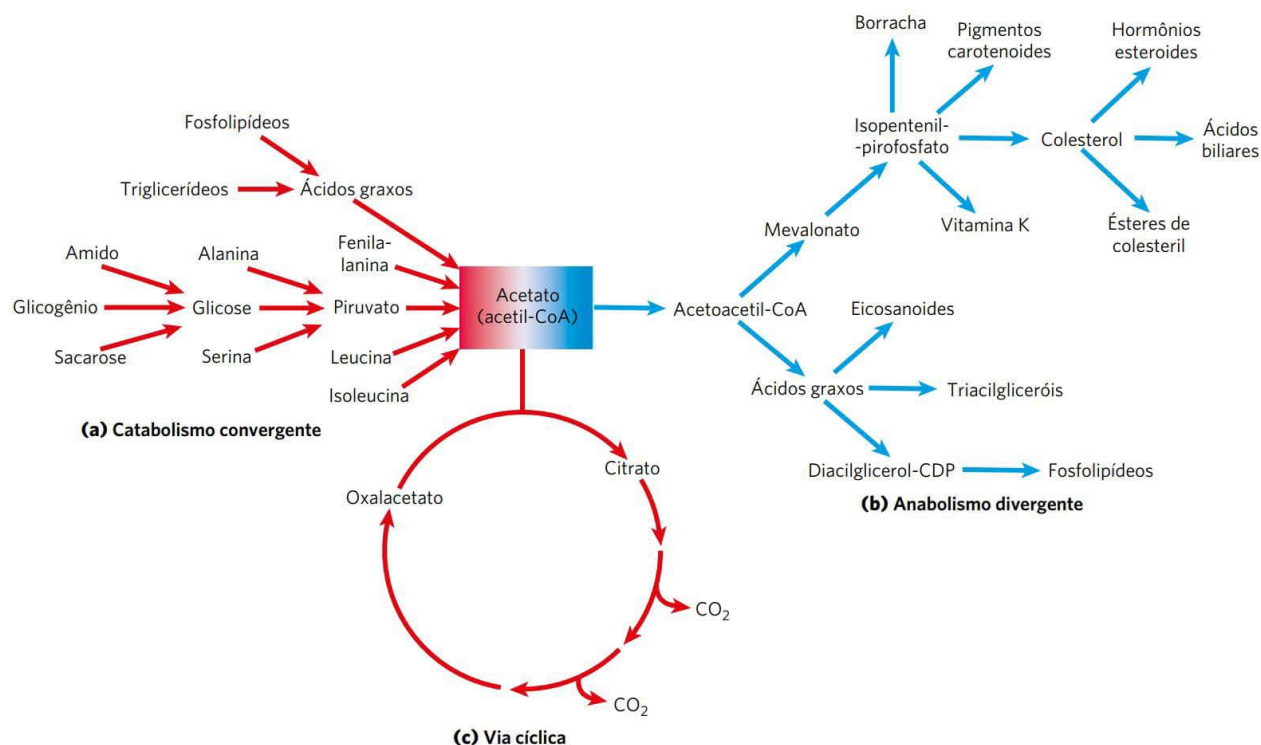


FIGURA 4 Três tipos de vias metabólicas não lineares. **(a)** Convergente, catabólica, **(b)** divergente, anabólica e **(c)** cíclica. Em (c), um dos compostos de partida (no caso, o oxalacetato) é regenerado e reingressa na via. O acetato, um intermediário metabólico chave, é o produto da degradação de uma grande variedade de combustíveis (a), serve de precursor para um grande número de produtos (b) e é consumido na via catabólica conhecida como o ciclo do ácido cítrico (c).

nucleotídeos a partir de precursores simples. O Capítulo 23 retomará uma visão detalhada das vias metabólicas, como elas ocorrem em todos os organismos, desde *Escherichia coli* até o ser humano, e considerará como elas são reguladas e integradas nos mamíferos por meio de mecanismos hormonais.

Antes de se iniciar o estudo do metabolismo intermediário, uma palavra final deve ser dita. Tenha sempre em mente que o conjunto de reações descritas nas páginas deste livro ocorre nos seres vivos e desempenha papéis cruciais para

eles. Cada vez que aparecer uma reação de uma via deve ser perguntado: como essa peça se encaixa no quadro geral? O que essa transformação química faz para o organismo? Como essa via se interconecta com outras vias que estão operando simultaneamente na mesma célula para produzir a energia e os produtos necessários para a célula se manter e crescer? Estudado sob essa perspectiva, o metabolismo traz conhecimentos fascinantes e reveladores sobre a vida, com um sem número de aplicações em medicina, agricultura e biotecnologia.

Bioenergética e metabolismo

- 13.1 Bioenergética e termodinâmica 495
- 13.2 Lógica química e reações bioquímicas comuns 501
- 13.3 Transferência de grupos fosforila e ATP 507
- 13.4 Reações biológicas de oxidação-redução 517

As células e os organismos vivos devem realizar trabalho para se manterem vivos, crescerem e se reproduzirem. A capacidade de controlar a energia e direcioná-la para o trabalho biológico é uma propriedade fundamental de todos os organismos vivos. Essa capacidade deve ter sido adquirida muito cedo no curso da evolução celular. Os organismos modernos realizam uma incrível variedade de transduções da energia, conversões de uma forma de energia em outra. Eles usam a energia química dos combustíveis para sintetizar macromoléculas complexas, altamente organizadas, a partir de precursores simples. Também convertem a energia química dos combustíveis em gradientes de concentração e em gradientes elétricos, em movimento e calor e, em alguns organismos, como o vagalume e os peixes do fundo oceânico, em luz. Os organismos fotossintéticos transformam a energia luminosa em todas essas outras formas de energia.

Os mecanismos químicos envolvidos nas transduções biológicas de energia têm fascinado e desafiado os biólogos através dos séculos. O químico francês Antoine Lavoisier reconheceu que, de alguma forma, os animais transformam os combustíveis químicos (alimentos) em calor e que esse processo de respiração é essencial para a vida. Ele observou que

[...] em geral, a respiração é nada mais do que a combustão lenta de carbono e hidrogênio, semelhante à que ocorre em uma lamparina ou em uma vela acesa, e, desse ponto de vista, animais que respiram são corpos combustíveis que queimam e consomem a si próprios.[...] Alguém poderia dizer que essa analogia entre combustão e respiração não passou despercebida pelos poetas, ou ainda pelos filósofos da antiguidade, já tendo sido relatada e interpretada por eles. Esse fogo roubado dos céus, essa tocha de Prometeu, não representa apenas uma ideia engenhosa e poética, ele é um retrato fiel das operações da natureza, pelo menos para os animais que respiram; portanto, alguns podem dizer, como os antigos, que a tocha da vida ilumina a si mesma no momen-

to em que a criança respira pela primeira vez, e ela só se extingue com a morte.*

A partir do século XX, aumentou a compreensão sobre a química relacionada à “tocha da vida”. As transduções biológicas de energia obedecem às mesmas leis químicas e físicas que governam todos os outros processos naturais. Portanto, é fundamental para um estudante de bioquímica entender essas leis e como elas se aplicam ao fluxo de energia que ocorre na biosfera.

Este capítulo se inicia com uma revisão das leis da termodinâmica e a relação quantitativa entre energia livre, entalpia e entropia. Em seguida, serão revisados os tipos comuns de reações bioquímicas que ocorrem em células vivas, reações que controlam, armazenam, transferem e liberam a energia adquirida pelos organismos do seu meio ambiente. Então, serão focalizadas as reações com funções especiais nas trocas biológicas de energia, particularmente aquelas envolvendo ATP. Por fim, será considerada a importância das reações de oxidação-redução em células vivas, as variações energéticas nas transferências biológicas de elétrons e os transportadores de elétrons comumente utilizados como cofatores nesses processos.



Antoine Lavoisier, 1743-1794
[Fonte: INTERFOTO/Alamy.]

13.1 Bioenergética e termodinâmica

Bioenergética é o estudo quantitativo das **transduções de energia** que ocorrem em células vivas, isto é, mudança de uma forma de energia a outra e a natureza e a função dos processos químicos envolvidos nessas transduções. Embora muitos dos princípios da termodinâmica tenham sido introduzidos em capítulos anteriores, podendo, assim, já serem familiares, uma revisão dos aspectos quantitativos desses princípios é útil.

*A partir das memórias de Armand Seguin e Antoine Lavoisier, datado de 1789, citado em A. Lavoisier, *Oeuvres de Lavoisier*, Imprimerie Impériale, Paris, 1862.

As transformações biológicas de energia obedecem às leis da termodinâmica

Muitas observações quantitativas feitas por físicos e químicos sobre a interconversão de diferentes formas de energia levaram, no século XIX, à formulação das duas leis fundamentais da termodinâmica. A primeira lei é o princípio da conservação da energia: *para qualquer mudança física ou química, a quantidade total de energia no universo permanece constante; a energia pode mudar de forma ou pode ser transportada de uma região para outra, mas não pode ser criada ou destruída*. A segunda lei da termodinâmica, que pode ser enunciada de diferentes formas, diz que o universo sempre tende para o aumento da desordem: *em todos os processos naturais, a entropia do universo aumenta*.



[Fonte: Sidney Harris.]

Os organismos vivos são formados por um conjunto de moléculas com um grau de organização muito maior do que o dos componentes do meio ambiente a partir dos quais eles são formados, e eles criam e mantêm a organização, aparentemente imunes à segunda lei da termodinâmica. No entanto, os organismos não violam a segunda lei; eles funcionam em rigorosa concordância com ela. Para discutir as aplicações da segunda lei aos sistemas biológicos, deve-se primeiro definir esses sistemas e o meio que os circundam.

Um *sistema reagente* é constituído pelo conjunto de componentes que estão sendo submetidos a um determinado processo químico ou físico; pode ser um organismo, uma célula, ou dois compostos reagentes. Juntos, o sistema reagente e o *meio ambiente* que o circunda constituem o universo. No laboratório, alguns processos físicos e químicos podem ser realizados isolados ou em sistemas fechados, nos quais não existe troca de material ou energia com o meio. No entanto, células vivas e organismos são sistemas abertos, trocam tanto matéria quanto energia com o meio ambiente. Os sistemas biológicos jamais atingem o equilíbrio com o meio, e a constante interação entre o sistema e o meio explica como os organismos podem se auto-organizar, funcionando em total acordo com a segunda lei da termodinâmica.

No Capítulo 1 (p. 23), foram definidos três parâmetros termodinâmicos que descrevem as trocas de energia que ocorrem em reações químicas:

Energia livre de Gibbs, G , expressa a quantidade de energia capaz de realizar trabalho durante uma reação a temperatura e pressão constantes. Quando uma reação ocorre com a liberação de energia livre (i.e., quando o sistema se transforma, de modo a possuir menos energia livre), a variação da energia livre, ΔG , possui um valor negativo, e a reação é chamada de **exergônica**. Nas reações **endergônicas**, o sistema ganha energia livre, e ΔG é positivo.

Entalpia, H , é o conteúdo de calor do sistema reagente. Ela reflete o número e o tipo de ligações químicas nos reagentes e produtos. Quando uma reação química libera calor, ela é dita **exotérmica**; o conteúdo em calor dos produtos é menor do que o dos reagentes, e a variação na entalpia, ΔH , tem por convenção um valor negativo. Sistemas reagentes que tomam calor do meio são **endotérmicos**, e o valor de ΔH é positivo.

Entropia, S , é uma expressão quantitativa da aleatoriedade ou desordem de um sistema (ver Quadro 1-3). Quando os produtos de uma reação são menos complexos e mais desordenados do que os reagentes, a reação ocorre com ganho de entropia.

As unidades de ΔG e ΔH são joules/mol ou calorias/mol (lembre-se de que $1 \text{ cal} = 4,184 \text{ J}$); as unidades de entropia são joules/mol·Kelvin ($\text{J/mol}\cdot\text{K}$) (Tabela 13-1).

Sob as condições existentes nos sistemas biológicos (incluindo temperatura e pressão constantes), as variações de energia livre, entalpia e entropia estão quantitativamente relacionadas pela equação

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (13-1)$$

em que ΔG é a variação na energia livre de Gibbs do sistema reagente, ΔH é a variação na entalpia do sistema, T é a temperatura absoluta e ΔS é a variação da entropia do sistema. Por convenção, ΔS possui sinal positivo quando a entropia aumenta, e ΔH , como mencionado anteriormente, possui sinal negativo quando o sistema libera calor para o meio. Em qualquer uma dessas condições, as duas são típicas dos processos energeticamente favoráveis, tendem a fazer ΔG ser negativo. De fato, ΔG dos sistemas que reagem espontaneamente é sempre negativo.

A segunda lei da termodinâmica afirma que a entropia *do universo* aumenta durante todos os processos químicos e físicos, embora o aumento da entropia não ocorra necessariamente *no próprio sistema reagente*. A organização produzida dentro das células, à medida que elas crescem e se dividem, é mais do que compensada pela desordem que é gerada no meio durante o curso do crescimento e da divisão (ver Quadro 1-3, caso 2). Em resumo, os organismos vivos preservam sua organização interna por captarem a energia livre do meio na forma de nutrientes ou luz solar e devolverem a ele uma quantidade de energia igual, na forma de calor e entropia.

TABELA 13-1 Algumas constantes físicas e unidades utilizadas na termodinâmica

Constante de Boltzmann, $k = 1,381 \times 10^{-23} \text{ J/K}$
Número de Avogadro, $N = 6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$
Constante de Faraday, $F = 96.480 \text{ J/V}\cdot\text{mol}$
Constantes dos gases, $R = 8,315 \text{ J/mol}\cdot\text{K}$ ($= 1,987 \text{ cal/mol}\cdot\text{K}$)
As unidades de ΔG e ΔH são J/mol (ou cal/mol)
As unidades de ΔS são J/mol·K (ou cal/mol·K)
1 cal = 4,184 J
A unidade de temperatura absoluta, T , é o grau Kelvin, K
25°C = 298 K
A 25°C, $RT = 2,478 \text{ kJ/mol}$ ($= 0,592 \text{ kcal/mol}$)

As células necessitam de fontes de energia livre

As células são sistemas isotérmicos – elas funcionam essencialmente em temperaturas constantes (e também em pressão constante). O fluxo de calor não é uma fonte de energia para as células, já que o calor é capaz de realizar trabalho somente quando passa para uma região ou para um objeto com temperatura inferior. A energia que as células podem e devem utilizar é a energia livre, descrita como uma função da energia livre de Gibbs, G , que permite prever o sentido das reações químicas, sua posição de equilíbrio exata e a quantidade de trabalho que elas podem (em teoria) realizar em temperatura e pressão constantes. As células heterotróficas adquirem energia livre a partir das moléculas de nutrientes, e as células fotossintetizantes adquirem energia livre da radiação solar absorvida. Os dois tipos de células transformam essa energia livre em ATP e em outros compostos ricos em energia, capazes de fornecer energia para a realização de trabalho biológico em temperatura constante.

A variação da energia livre padrão está diretamente relacionada à constante de equilíbrio

A composição de um sistema reagente (uma mistura de reagentes e produtos químicos) tende a variar continuamente até que o equilíbrio seja atingido. Nas concentrações de equilíbrio dos reagentes e dos produtos, as velocidades das reações direta e inversa são exatamente as mesmas e não há qualquer variação líquida no sistema. As concentrações dos reagentes e dos produtos *no equilíbrio* definem a constante de equilíbrio, K_{eq} (p. 25). Na reação geral



em que a , b , c , e d representam o número de moléculas de A, B, C e D participantes, a constante de equilíbrio é dada por

$$K_{\text{eq}} = \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b} \quad (13-2)$$

em que $[A]$, $[B]$, $[C]$ e $[D]$ são as concentrações molares dos componentes da reação no ponto de equilíbrio.

Quando o sistema reagente não está em equilíbrio, a tendência em direção ao equilíbrio representa uma força motriz cuja intensidade pode ser expressa como a variação de energia livre para a reação, ΔG . Sob condições-padrão (298 K = 25°C), quando a concentração inicial dos reagentes e produtos é 1 M ou, para os gases, pressões parciais de 101,3 kilopascals (kPa), ou 1 atm, a força que impulsiona o sistema para o equilíbrio é definida como a variação de energia livre padrão, ΔG° . Segundo essa definição, o estado-padrão para as reações que envolvem íons hidrogênio é $[H^+] = 1 \text{ M}$, ou pH 0. A maioria das reações bioquímicas, no entanto, ocorre em soluções aquosas devidamente tamponadas em valores de pH próximos a 7; tanto o pH como a concentração da água (55,5 M) são essencialmente constantes.

» **Convenção-chave:** para facilitar os cálculos, os bioquímicos definem um estado-padrão diferente daquele que é usado na química. No estado-padrão bioquímico, $[H^+]$ é 10^{-7} M (pH 7) e $[H_2O]$ é 55,5 M. Para as reações que envolvem Mg^{2+} (que incluem a maioria das reações nas quais ATP é um dos reagentes), $[Mg^{2+}]$ na solução é geralmente considerada como constante em 1 mM. «

As constantes físicas baseadas nesse padrão bioquímico são denominadas **constantes-padrão transformadas** e são escritas com o símbolo de prima (ou linha) (como em $\Delta G'^\circ$ e K'_{eq}) para diferenciá-las das constantes não transformadas usadas pelos químicos e pelos físicos. (Observe que muitos outros livros usam o símbolo $\Delta G'^\circ$ no lugar de $\Delta G'^\circ$. O uso, neste livro, de $\Delta G'^\circ$, recomendado por um comitê internacional de químicos e bioquímicos, tem a intenção de enfatizar que a variação de energia livre transformada, $\Delta G'^\circ$, é o critério para definir o equilíbrio.) Para simplificar, a partir de agora essas constantes transformadas serão chamadas de **variações de energia livre padrão** e **constantes de equilíbrio padrão**.

» **Convenção-chave:** em outra simplificação de convenções usada pelos bioquímicos, quando H_2O , H^+ e/ou Mg^{2+} forem reagentes ou produtos, as suas concentrações não serão incluídas em equações, como, por exemplo, a Equação 13-2, mas incorporadas dentro das próprias constantes K'_{eq} e $\Delta G'^\circ$. «

Do mesmo modo que K'_{eq} é a constante física característica de cada reação, $\Delta G'^\circ$ também é uma constante. Como foi ressaltado no Capítulo 6, existe uma relação simples entre K'_{eq} e $\Delta G'^\circ$:

$$\Delta G'^\circ = -RT \ln K'_{\text{eq}} \quad (13-3)$$

A variação de energia livre padrão de uma reação química é simplesmente uma forma matemática alternativa para expressar a sua constante de equilíbrio. A Tabela 13-2 mostra a relação entre $\Delta G'^\circ$ e K'_{eq} . Se a constante de equilíbrio para uma determinada reação for igual a 1,0, a variação de energia livre padrão dessa reação é igual a zero (o logaritmo natural de 1,0 é zero). Quando a K'_{eq} de uma reação for maior que 1,0, $\Delta G'^\circ$ é negativo. Quando a K'_{eq} for menor que 1,0, $\Delta G'^\circ$ é positivo. Como a relação entre $\Delta G'^\circ$ e K'_{eq} é exponencial, variações relativamente pequenas em $\Delta G'^\circ$ correspondem a grandes variações em K'_{eq} .

TABELA 13-2 Relação entre as constantes de equilíbrio e as variações de energia livre das reações químicas

K'_{eq}	$\Delta G'^{\circ}$	
	(kJ/mol)	(kcal/mol) ^a
10^3	-17,1	-4,1
10^2	-11,4	-2,7
10^1	-5,7	-1,4
1	0,0	0,0
10^{-1}	5,7	1,4
10^{-2}	11,4	2,7
10^{-3}	17,1	4,1
10^{-4}	22,8	5,5
10^{-5}	28,5	6,8
10^{-6}	34,2	8,2

^aEmbora joules e kilojoules sejam as unidades-padrão para energia e sejam utilizadas ao longo deste livro, os bioquímicos e os nutricionistas por vezes expressam os valores de $\Delta G'^{\circ}$ em kilocalorias por mol. Consequentemente, nesta tabela e nas Tabelas 13-4 e 13-6 foram incluídos valores tanto em kilojoules como em quilocalorias. Para converter kilojoules em quilocalorias, basta dividir o número de kilojoules por 4,184.

Pode ser útil pensar na variação de energia livre de outra forma. $\Delta G'^{\circ}$ é a diferença entre o conteúdo de energia livre dos produtos e o conteúdo de energia livre dos reagentes, em condições-padrão. Quando $\Delta G'^{\circ}$ for negativo, os produtos contêm menos energia livre do que os reagentes, e a reação ocorrerá espontaneamente em condições-padrão; todas as reações químicas tendem a seguir no sentido que leva a um decréscimo na energia livre do sistema. Um valor positivo de $\Delta G'^{\circ}$ significa que os produtos da reação contêm mais energia livre do que os reagentes e essa reação tende a ocorrer no sentido inverso se for iniciada com todos os componentes em concentrações de 1,0 M (condições-padrão). A Tabela 13-3 resume esses pontos.

PROBLEMA 13-1 Cálculo de $\Delta G'^{\circ}$

Calcular a variação de energia livre padrão da reação catalisada pela enzima fosfoglicomutase:



considerando que a reação começa com 20 mM de glicose-1-fosfato e nada de glicose-6-fosfato, o equilíbrio final da mistura a 25°C e pH 7,0 contém 1,0 mM de glicose-1-fosfato e 19 mM de glicose-6-fosfato. A reação no sentido da formação de glicose-6-fosfato ocorre com perda ou ganho de energia livre?

Solução: primeiro calcula-se a constante de equilíbrio:

$$K'_{eq} = \frac{[\text{glicose-6-fosfato}]}{[\text{glicose-1-fosfato}]} = \frac{19 \text{ mM}}{1,0 \text{ mM}} = 19$$

TABELA 13-3 As relações entre K'_{eq} , $\Delta G'^{\circ}$ e a direção das reações químicas

Quando K'_{eq} for...	$\Delta G'^{\circ}$ é...	Inicia com todos os componentes em 1 M...
> 1,0	negativo	ocorre no sentido direto
1,0	zero	está no equilíbrio
< 1,0	positivo	ocorre no sentido inverso

Agora, é possível calcular a variação de energia livre padrão:

$$\begin{aligned}\Delta G'^{\circ} &= -RT \ln K'_{eq} \\ &= -(8,315 \text{ J/mol} \cdot \text{K})(298 \text{ K})(\ln 19) \\ &= -7,3 \text{ kJ/mol}\end{aligned}$$

Como a variação de energia livre padrão é negativa, a conversão de glicose-1-fosfato em glicose-6-fosfato ocorre com perda (liberação) de energia livre. (No caso da reação inversa, $\Delta G'^{\circ}$ é igual, mas com sinal *contrário*.)

A Tabela 13-4 fornece a variação de energia livre padrão de algumas reações químicas representativas. Observe que a hidrólise de ésteres simples, amidas, peptídeos e glicosídeos, assim como os rearranjos e as eliminações, ocorrem com variações relativamente pequenas de energia livre padrão, ao passo que a hidrólise de anidridos de ácidos é acompanhada por decréscimo relativamente grande da energia livre padrão. A oxidação completa de compostos orgânicos, como a glicose ou o palmitato, em CO_2 e H_2O , reações que requerem muitas etapas nas células, resulta em um decréscimo muito grande da energia livre padrão. No entanto, as variações de energia livre padrão, como as apresentadas na Tabela 13-4, indicam o quanto de energia livre está disponível a partir de uma reação em *condições-padrão*. Para descrever a energia liberada sob as condições existentes nas células, é essencial uma expressão para a variação de energia livre *real*.

A variação de energia livre real depende das concentrações dos reagentes e dos produtos

Deve-se ter o cuidado de não confundir duas grandezas diferentes, a variação de energia livre real, ΔG , e a variação de energia livre padrão, $\Delta G'^{\circ}$. Cada reação química possui uma variação de energia livre padrão característica, que pode ser positiva, negativa ou nula, dependendo da constante de equilíbrio da reação. A variação de energia livre padrão nos diz em que sentido e até onde uma dada reação deve seguir para atingir o equilíbrio *quando a concentração inicial de cada componente for 1,0 M*, em pH 7,0, temperatura de 25°C e pressão de 101,3 kPa (1 atm). Portanto, $\Delta G'^{\circ}$ é uma constante: ela tem uma característica, o valor fixo e invariável de cada reação. No entanto, a variação da energia livre *real*, ΔG , é uma função das concentrações dos reagentes e produtos e da temperatura que prevalece durante a reação, e nenhum desses parâmetros será necessariamente igual

TABELA 13-4 Variações de energia livre padrão de algumas reações químicas

Tipo de reação	$\Delta G'^{\circ}$	
	(kJ/mol)	(kcal/mol)
Reações de hidrólise		
Anidridos de ácidos		
Anidrido acético + H ₂ O \longrightarrow 2 acetato	-91,1	-21,8
ATP + H ₂ O \longrightarrow ADP + P _i	-30,5	-7,3
ATP + H ₂ O \longrightarrow AMP + PP _i	-45,6	-10,9
PP _i + H ₂ O \longrightarrow 2 P _i	-19,2	-4,6
UDP-glicose + H ₂ O \longrightarrow UMP + glicose-1-fosfato	-43,0	-10,3
Ésteres		
Acetato de etila + H ₂ O \longrightarrow etanol + acetato	-19,6	-4,7
Glicose-6-fosfato + H ₂ O \longrightarrow glicose + P _i	-13,8	-3,3
Amidas e peptídeos		
Glutamina + H ₂ O \longrightarrow glutamato + NH ₄ ⁺	-14,2	-3,4
Glicilglicina + H ₂ O \longrightarrow 2 glicina	-9,2	-2,2
Glicosídeos		
Maltose + H ₂ O \longrightarrow 2 glicose	-15,5	-3,7
Lactose + H ₂ O \longrightarrow glicose + galactose	-15,9	-3,8
Rearranjos		
Glicose-1-fosfato \longrightarrow glicose-6-fosfato	-7,3	-1,7
Frutose-6-fosfato \longrightarrow glicose-6-fosfato	-1,7	-0,4
Eliminação de água		
Malato \longrightarrow fumarato + H ₂ O	3,1	0,8
Oxidação com oxigênio molecular		
Glicose + 6 O ₂ \longrightarrow 6 CO ₂ + 6 H ₂ O	-2.840	-686
Palmitato + 23 O ₂ \longrightarrow 16 CO ₂ + 16 H ₂ O	-9.770	-2.338

às condições-padrão, definidas anteriormente. Além disso, o valor de ΔG de qualquer reação que ocorra espontaneamente em direção ao equilíbrio é sempre negativo, torna-se menos negativo ao longo da reação e é zero no ponto de equilíbrio, indicando que a reação já não pode mais realizar trabalho.

ΔG e $\Delta G'^{\circ}$ para qualquer reação estão relacionadas, conforme a equação

$$\Delta G = \Delta G'^{\circ} + RT \ln \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b} \quad (13-4)$$

na qual os termos em vermelho são aqueles que *realmente prevalecem* no sistema em observação. A concentração dos termos nessa equação expressa o efeito comumente chamado de ação das massas, e o termo $[C]^c [D]^d / [A]^a [B]^b$ é chamado

de **razão da ação das massas, Q** . Então, a Equação 13-4 pode ser expressa como $\Delta G = \Delta G'^{\circ} + RT \ln Q$. A título de exemplo, suponha que a reação $A + B \rightleftharpoons C + D$ ocorra sob condições-padrão de temperatura (25°C) e pressão (101,3 kPa), mas que as concentrações de A, B, C e D *não* sejam iguais e nenhum dos componentes esteja presente na concentração padrão de 1,0 M. Para determinar a variação de energia livre real, ΔG , nessas condições não padrões de concentrações da reação que segue da esquerda para a direita, basta simplesmente entrar com as concentrações *reais* de A, B, C e D na Equação 13-4; os valores de R , T e $\Delta G'^{\circ}$ são os valores-padrão. ΔG é negativo e se aproxima do zero à medida que a reação avança, já que, com o correr da reação, as concentrações reais de A e B diminuem, e as concentrações de C e D aumentam. Observe que, quando a reação chega no equilíbrio – quando não há mais força que

estímulo a reação em nenhum dos sentidos e ΔG é zero –, a Equação 13-4 reduz-se a

$$0 = \Delta G = \Delta G'^{\circ} + RT \ln \frac{[C]_{\text{eq}}[D]_{\text{eq}}}{[A]_{\text{eq}}[B]_{\text{eq}}}$$

ou

$$\Delta G'^{\circ} = -RT \ln K'_{\text{eq}}$$

que é a equação que relaciona a variação de energia livre padrão e a constante de equilíbrio (Equação 13-3).

O critério de espontaneidade de uma reação é o valor de ΔG , e não de $\Delta G'^{\circ}$. Reações com valores de $\Delta G'^{\circ}$ positivos podem ocorrer na direção inversa se ΔG for negativo. Isso é possível caso o termo $RT \ln ([\text{produtos}]/[\text{reagentes}])$ da Equação 13-4 for negativo e tiver um valor absoluto maior do que $\Delta G'^{\circ}$. Por exemplo, a remoção imediata dos produtos de uma reação pode manter a relação $[\text{produtos}]/[\text{reagentes}]$ muito abaixo de 1, de forma que o termo $RT \ln ([\text{produtos}]/[\text{reagentes}])$ apresenta um grande valor negativo. $\Delta G'^{\circ}$ e ΔG são expressões da quantidade máxima em que, em teoria, pode ser liberada uma quantidade de energia que só pode ser conseguida caso se tenha um mecanismo absolutamente eficiente para coletar e capturar essa energia. Já que tal dispositivo não é factível (durante qualquer processo, parte da energia sempre é perdida para a entropia), a quantidade de trabalho realizada pela reação a temperatura e pressão constantes é sempre menor que a quantidade teoricamente disponível.

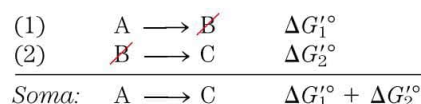
Outro ponto importante é que algumas reações termodinamicamente favoráveis (i.e., reações nas quais $\Delta G'^{\circ}$ é grande e negativo) não ocorrem em velocidades que possam ser medidas. Por exemplo, a combustão da lenha em CO_2 e H_2O é muito favorável termodinamicamente, mas a lenha permanece estável por anos, já que a energia de ativação (ver Figuras 6-2 e 6-3) para a reação de combustão é maior do que a energia disponível à temperatura ambiente. Se a energia de ativação necessária for fornecida (p. ex., por um fósforo aceso), a combustão terá início, convertendo a madeira nos produtos mais estáveis CO_2 e H_2O e liberando energia nas formas de calor e luz. O calor liberado por essa reação exotérmica fornece a energia de ativação para a combustão das regiões vizinhas da lenha, e, assim, o processo se autopropaga.

Nas células vivas, as reações que seriam extremamente lentas caso não fossem catalisadas ocorrem não pelo fornecimento de calor adicional, mas sim pela redução da energia de ativação devida ao uso de enzimas. Uma enzima fornece uma via de reação alternativa com energia de ativação menor do que a reação não catalisada, de forma que, à temperatura ambiente, uma grande fração das moléculas de substrato possui energia térmica suficiente para superar a barreira de ativação, aumentando drasticamente a velocidade da reação. A variação de energia livre para uma reação é independente da via pela qual a reação ocorre; ela depende apenas da natureza e das concentrações dos reagentes iniciais e dos produtos finais. Portanto, as enzimas não podem alterar as constantes de equilíbrio; o que elas fazem é aumentar a

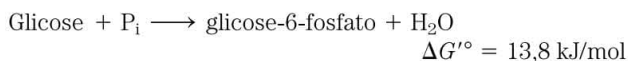
velocidade pela qual a reação ocorre no sentido determinado pela termodinâmica (ver Seção 6.2).

As variações de energia livre padrão são aditivas

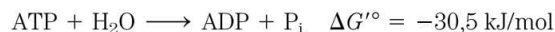
No caso de duas reações químicas que ocorram em sequência, $A \rightleftharpoons B$ e $B \rightleftharpoons C$, cada reação tem sua própria constante de equilíbrio e cada uma tem sua própria variação de energia livre padrão, $\Delta G_1'^{\circ}$ e $\Delta G_2'^{\circ}$. Como as duas reações ocorrem em sequência, B pode ser cancelado, dando uma reação geral $A \rightleftharpoons C$, que tem sua própria constante de equilíbrio e sua própria variação de energia livre padrão, $\Delta G_{\text{soma}}'^{\circ}$. Os valores de $\Delta G'^{\circ}$ de uma sequência de reações químicas são aditivos. Para a reação geral $A \rightleftharpoons C$, $\Delta G_{\text{soma}}'^{\circ}$ é a soma das duas variações de energia livre padrão, $\Delta G_1'^{\circ}$ e $\Delta G_2'^{\circ}$ das duas reações: $\Delta G_{\text{soma}}'^{\circ} = \Delta G_1'^{\circ} + \Delta G_2'^{\circ}$.



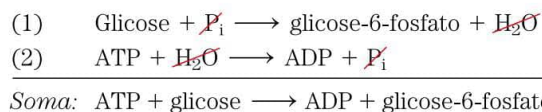
Este princípio da bioenergética explica como uma reação termodinamicamente desfavorável (endergônica) pode ocorrer no sentido direto: acoplando-a a uma reação altamente exergônica por meio de um intermediário comum. Por exemplo, em muitos organismos, a síntese de glicose-6-fosfato é a primeira etapa na utilização da glicose. Em princípio, essa síntese não poderia ocorrer por meio dessa reação:



O valor positivo de $\Delta G'^{\circ}$ prediz que, sob condições padrões, a reação não tenderia a ocorrer espontaneamente na direção em que está escrita. Outra reação celular, a hidrólise de ATP em ADP e P_i , é muito exergônica:



Essas duas reações compartilham os intermediários comuns, P_i e H_2O , e podem ser expressas como reações sequenciais:



A variação de energia livre total é obtida somando-se os valores de $\Delta G'^{\circ}$ de cada reação:

$$\Delta G_{\text{soma}}'^{\circ} = 13,8 \text{ kJ/mol} + (-30,5 \text{ kJ/mol}) = -16,7 \text{ kJ/mol}$$

A reação global é exergônica. Neste caso, a energia armazenada no ATP é utilizada para promover a síntese de glicose-6-fosfato, ainda que a formação de glicose-6-fosfato a partir de glicose e fosfato inorgânico (P_i) seja endergônica. A via de formação de glicose-6-fosfato a partir de glicose pela transferência do grupo fosforila do ATP é diferente das reações (1) e (2) descritas anteriormente, embora o resultado final seja equivalente ao somatório das duas reações.

Nos cálculos termodinâmicos, tudo o que importa é o estado do sistema no início e no fim do processo; o caminho entre os estados inicial e final é irrelevante.

Foi dito anteriormente que $\Delta G'^{\circ}$ é uma maneira de expressar a constante de equilíbrio de uma reação. Para a reação (1) acima,

$$K'_{\text{eq}_1} = \frac{[\text{glicose-6-fosfato}]}{[\text{glicose}][\text{P}_i]} = 3,9 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}$$

Observe que a H_2O não está incluída nessa expressão, e considera-se que a sua concentração (55,5 M) permanece inalterada durante a reação. A constante de equilíbrio para a hidrólise de ATP é

$$K'_{\text{eq}_2} = \frac{[\text{ADP}][\text{P}_i]}{[\text{ATP}]} = 2,0 \times 10^5 \text{ M}$$

Portanto, a constante de equilíbrio para as duas reações acopladas é

$$\begin{aligned} K'_{\text{eq}_3} &= \frac{[\text{glicose-6-fosfato}][\text{ADP}][\text{P}_i]}{[\text{glicose}][\text{P}_i][\text{ATP}]} \\ &= (K'_{\text{eq}_1})(K'_{\text{eq}_2}) = (3,9 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1})(2,0 \times 10^5 \text{ M}) \\ &= 7,8 \times 10^2 \end{aligned}$$

Esse cálculo ilustra um ponto muito importante sobre as constantes de equilíbrio: os valores de $\Delta G'^{\circ}$ das duas reações que se juntam para fazer a reação geral se *somam*, e o K'_{eq} da reação geral é o *produto* dos valores das K'_{eq} das duas reações. As constantes de equilíbrio são *multiplicativas*. Devido ao acoplamento da hidrólise de ATP à síntese de glicose-6-fosfato, a K'_{eq} para a formação de glicose-6-fosfato a partir de glicose aumenta na ordem de 2×10^5 .

Esta estratégia envolvendo intermediários comuns é utilizada por todas as células vivas na síntese de intermediários metabólicos e de componentes celulares. É evidente que a estratégia funciona apenas se compostos como o ATP estiverem disponíveis continuamente. Nos capítulos seguintes, serão consideradas algumas das vias celulares mais importantes para a produção de ATP. Ver os exemplos de exercícios do Capítulo 1 (pp. 25-25) para obter mais prática em trabalhar com variação de energia livre e constantes de equilíbrio de reações acopladas.

RESUMO 13.1 Bioenergética e termodinâmica

- As células vivas realizam trabalho constantemente. As células necessitam de energia para manterem as suas estruturas altamente organizadas, sintetizarem componentes celulares, transportarem moléculas pequenas e íons através de membranas e gerarem correntes elétricas.
- A bioenergética é o estudo quantitativo das relações de energia e conversões energéticas em sistemas biológicos. As transformações biológicas de energia obedecem às leis da termodinâmica.
- Todas as reações químicas são influenciadas por duas forças: a tendência de atingirem o estado de ligação mais estável (e para isso a entalpia, H , é uma expressão

útil) e a tendência de atingem o maior grau possível de desordem (aleatoriedade), expressa como entropia, S . A força líquida que impulsiona uma reação é ΔG , a variação de energia livre que representa o efeito líquido desses dois fatores: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$.

- A variação de energia livre transformada, $\Delta G'^{\circ}$, é uma constante física que é característica de determinada reação e pode ser calculada a partir da constante de equilíbrio da reação: $\Delta G'^{\circ} = -RT \ln K'_{\text{eq}}$.
- A variação de energia livre real, ΔG , é uma variável que depende de $\Delta G'^{\circ}$ e das concentrações dos reagentes e dos produtos: $\Delta G = \Delta G'^{\circ} + RT \ln ([\text{produtos}]/[\text{reagentes}])$.
- Quando ΔG for grande e negativa, a reação tende a seguir na direção direta; quando ΔG for grande e positiva, a reação tende a seguir no sentido inverso; e quando $\Delta G = 0$, o sistema está no equilíbrio.
- A variação de energia livre de uma reação não depende da via pela qual a reação ocorre. As variações de energia livre são aditivas; a reação química final resultante de sucessivas reações que compartilham intermediários comuns possui uma variação de energia livre global que é a soma dos valores de ΔG das reações individuais.

13.2 Lógica química e reações bioquímicas comuns

As transduções biológicas de energia abordadas neste livro são reações químicas. A química celular não abrange todos os tipos de reações geralmente estudadas nos cursos de química orgânica. Quais são as reações que ocorrem em sistemas biológicos e quais não é algo determinado pela (1) relevância que têm para um sistema metabólico em particular e (2) pela velocidade. As duas considerações são importantes para o formato das vias metabólicas que serão estudadas ao longo deste livro. Uma reação relevante é aquela que faz uso de um substrato disponível e o converte em um produto útil. No entanto, mesmo uma reação potencialmente relevante pode não ocorrer. Algumas transformações químicas são muito lentas (possuem energias de ativação muito altas) para poderem contribuir para os sistemas vivos, mesmo com a ajuda de poderosos catalisadores enzimáticos. As reações que ocorrem nas células representam uma “caixa de ferramentas” que a evolução usou para construir as vias metabólicas que contornam as reações “impossíveis”. Aprender a reconhecer as reações plausíveis pode ser de grande valia para desenvolver um conhecimento profundo em bioquímica.

Mesmo assim, o número de reações metabólicas que ocorrem em uma célula típica pode parecer exagerado. A maior parte das células tem a capacidade de realizar milhares de reações específicas, catalisadas por enzimas: por exemplo, a transformação de um nutriente simples como a glicose em aminoácidos, nucleotídeos ou lipídeos, a extração de energia a partir da oxidação de combustíveis e a polimerização de subunidades monoméricas em macromoléculas.

Para estudar essas reações, é essencial ter alguma organização. Existem padrões na química da vida e, assim, não é preciso estudar todas as reações individuais para compreender a lógica molecular da bioquímica. A maior parte das reações nas células vivas pertence a uma das cinco categorias gerais: (1) reações que criam ou quebram ligações carbono-carbono; (2) rearranjos internos, isomerizações e eliminações; (3) reações com radicais livres; (4) transferência de grupos; e (5) oxidação-redução. A seguir, cada uma dessas categorias será discutida em mais detalhes. Nos capítulos posteriores, serão citados alguns exemplos de cada tipo de reação. Observe que os cinco tipos de reações não são mutuamente excludentes; por exemplo, uma reação de isomerização pode envolver um intermediário do tipo radical livre.

No entanto, antes de dar continuidade, é preciso revisar dois princípios químicos básicos. Primeiro, uma ligação covalente consiste em um par de elétrons compartilhados, e a ligação pode ser rompida, em geral, de duas formas (**Figura 13-1**). Na **clivagem homolítica**, cada átomo deixa a ligação na forma de um **radical**, carregando um elétron desemparelhado. Na **clivagem heterolítica**, que é a mais comum, um átomo retém os dois elétrons da ligação. As espécies mais frequentemente geradas quando ligações C—C e C—H são clivadas estão ilustradas na Figura 13-1. Carbânions, carbocátions e íons hidreto são altamente instáveis e, como será visto, essa instabilidade caracteriza a química desses íons.

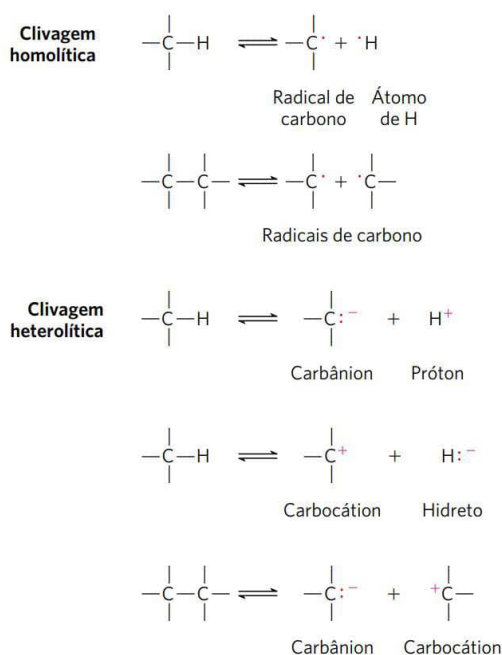


FIGURA 13-1 Dois mecanismos para clivar ligações C—C ou C—H. Em uma clivagem homolítica, cada átomo mantém um dos elétrons da ligação, resultando na formação de radicais de carbono (carbonos contendo elétrons não pareados) ou átomos de hidrogênio não carregados. Em uma clivagem heterolítica, um dos átomos retém os dois elétrons da ligação. Isso pode resultar na formação de carbânions, carbocátions, prótons ou íons hidreto.

O segundo princípio básico é que muitas reações bioquímicas envolvem interações entre **nucleófilos** (grupos funcionais ricos em elétrons e capazes de doá-los) e **eletrófilos** (grupos funcionais deficientes em elétrons e que os procuram). Os nucleófilos doam elétrons e se combinam com os eletrófilos. Os nucleófilos e eletrófilos mais comuns em biologia estão mostrados na **Figura 13-2**. Observe que um átomo de carbono pode agir tanto como um nucleófilo quanto um eletrófilo, dependendo das ligações e dos grupos funcionais que o rodeiam.

Reações que formam ou quebram ligações carbono-carbono A clivagem heterolítica de uma ligação C—C produz um **carbânion** e um **carbocátion** (Figura 13-1). Ao contrário, a formação de uma ligação C—C envolve a combinação de um carbânion nucleofílico e um carbocátion eletrofílico. Carbânions e carbocátions geralmente são tão instáveis que a sua formação como intermediários de reação pode ser energeticamente impossível, mesmo com catálise enzimática. Para a finalidade da bioquímica celular, essas reações são impossíveis, a não ser que seja fornecido um

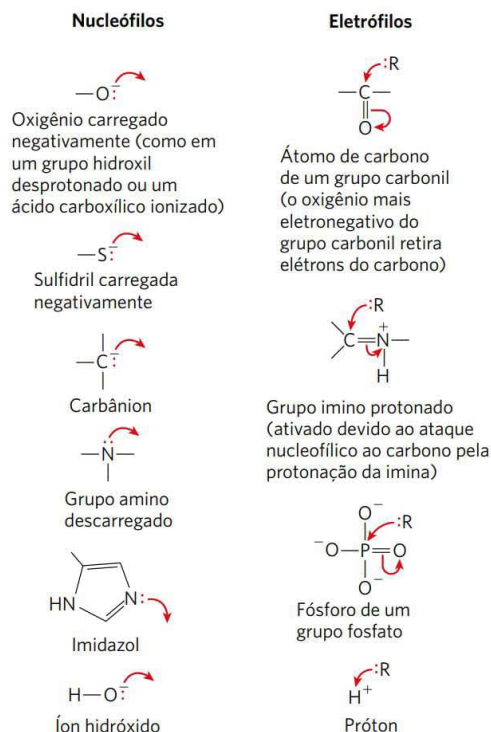


FIGURA 13-2 Nucleófilos e eletrófilos mais comuns em reações bioquímicas. Os mecanismos de reações químicas, que descrevem a formação e a quebra de ligações covalentes, estão representados por pontos e setas curvas, uma convenção informalmente conhecida como “trajetória do elétron”. Uma ligação covalente consiste em um par de elétrons compartilhado. Os elétrons importantes para o mecanismo da reação, que não participam da ligação, estão representados por pontos (•). As setas curvas (↷) representam o movimento do par de elétrons. Para o movimento de um único elétron (como em uma reação com radical livre), é usada uma seta de ponta única (tipo anzol) (↘). A maioria dos passos da reação envolve um par de elétrons não compartilhado.

auxílio químico na forma de grupos funcionais contendo átomos eletronegativos (O e N), que podem alterar a estrutura eletrônica dos átomos de carbonos adjacentes, de modo a estabilizar e facilitar a formação dos intermediários carbânion e carbocátion.

Os grupos carbonila são particularmente importantes nas transformações químicas das vias metabólicas. O átomo de carbono de um grupo carbonila possui uma carga positiva parcial devida à propriedade de retirar elétrons do oxigênio carbonílico, sendo, portanto, um carbono eletrofílico (**Figura 13-3a**). Um grupo carbonila pode, então, facilitar a formação de um carbânion em um carbono adjacente por deslocar as cargas negativas do carbânion (**Figura 13-3b**). Um grupo imino (ver **Figura 1-17**) pode ter uma função similar (**Figura 13-3c**). A capacidade de deslocar elétrons dos grupos carbonila e imino pode, ainda, ser potencializada por catálise ácida ou por um íon metálico, como o Mg^{2+} (**Figura 13-3d**).

A importância do grupo carbonila é evidente nas três principais classes de reações em que são formadas ou quebradas ligações C—C (**Figura 13-4**): condensações aldólicas, condensação de Claisen e descarboxilações. Em cada tipo de reação, um intermediário carbânion é estabilizado por um grupo carbonila, e, em muitos casos, outro grupo carbonila fornece o eletrófilo com o qual o carbânion nucleofílico reage.

A **condensação aldólica** é uma rota comum para a formação de ligações C—C; a reação da aldolase na glicólise, que converte um composto de seis átomos de carbono em dois compostos de três átomos de carbono, é o inverso de uma condensação aldólica (ver **Figura 14-6**). Em uma **condensação de Claisen**, o carbânion é estabilizado pelo carbonila de um tioéster adjacente; um exemplo é a síntese de citrato no ciclo do ácido cítrico (ver **Figura 16-9**). A descarboxilação também envolve, geralmente, a geração de um carbânion estabilizado por um grupo carbonila; um

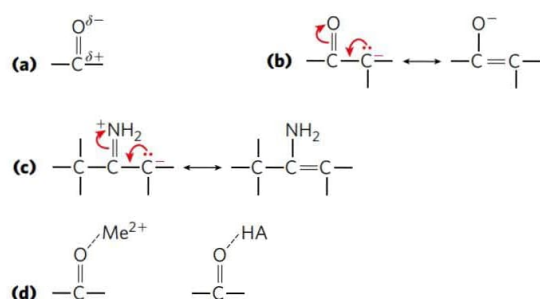
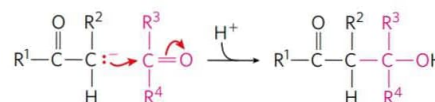
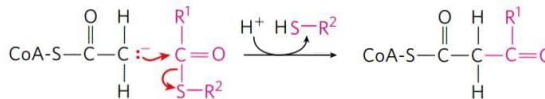


FIGURA 13-3 Propriedades químicas do grupo carbonila.

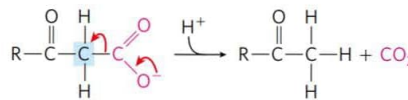
(a) O átomo de carbono de um grupo carbonila é um eletrófilo devido à capacidade de retirar elétrons do átomo de oxigênio eletronegativo, resultando em uma estrutura em que o carbono tem carga positiva parcial. (b) No interior de uma molécula, o deslocamento dos elétrons para um grupo carbonila facilita e estabiliza a formação de um carbânion em um carbono adjacente. (c) As iminas atuam como os grupos carbonila, facilitando a retirada dos elétrons. (d) Os grupos carbonila nem sempre funcionam sozinhos, a capacidade que têm como sugadores de elétrons é aumentada pela interação tanto com um íon metálico (Mg^{2+} , como Mg^{2+}), ou com um ácido geral (HA).



Condensação aldólica



Condensação de Claisen



Descarboxilação de um β -cetoácido

FIGURA 13-4 Algumas reações comuns de formação e quebra de ligações C—C em sistemas biológicos.

Tanto para a condensação aldólica como para a condensação de Claisen, um carbânion atua como nucleófilo, e o carbono de um grupo carbonila atua como eletrófilo. O carbânion é estabilizado em cada caso por outro grupo carbonila, do carbono adjacente ao carbânion. Na reação de descarboxilação, um carbânion é formado no carbono sombreado em azul quando o CO_2 é liberado. A reação não ocorreria em velocidade adequada sem o efeito estabilizador do carbonila adjacente ao carbânion. Em qualquer representação de um carbânion, supõe-se também a presença de uma ressonância estabilizadora com o carbonila adjacente, como mostrado na **Figura 13-3b**. Uma imina (**Figura 13-3c**) ou outro grupo removedor de elétrons (incluindo certos cofatores enzimáticos, como o piridoxal) pode substituir o grupo carbonila na estabilização dos carbânions.

exemplo é a reação da acetoacetato-decarboxilase, que leva à formação de corpos cetônicos durante o catabolismo dos ácidos graxos (ver **Figura 17-18**). Todas as vias metabólicas estão organizadas em torno da introdução de um grupo carbonila em uma localização particular, de modo que uma ligação carbono-carbono adjacente possa ser formada ou clivada. Em algumas reações, uma imina ou um cofator especializado, como o piridoxal-fosfato, desempenha o papel de removedores de elétrons no lugar do grupo carbonila.

O intermediário carbocátion que ocorre em algumas das reações que formam ou clivam ligações C—C é gerado pela eliminação de um bom grupo de saída, como o pirofosfato (ver **Reações de transferência de grupos a seguir**). Um exemplo é a reação da preniltransferase (**Figura 13-5**), uma etapa inicial na via de biossíntese do colesterol.

Rearranjos internos, isomerizações e eliminações Outro tipo comum de reação celular é o rearranjo intramolecular, no qual a redistribuição de elétrons leva a alterações de muitos tipos diferentes sem haver mudança no estado global de oxidação da molécula. Por exemplo, grupos diferentes em uma molécula podem sofrer oxidação-redução, sem variar o estado líquido de oxidação da molécula; grupos contendo ligação dupla podem sofrer um rearranjo *cis-trans*; ou as posições das ligações duplas podem ser mudadas. Um exemplo de uma isomerização envolvendo oxidação-redução é a formação de frutose-6-fosfato a partir de glicose-6-

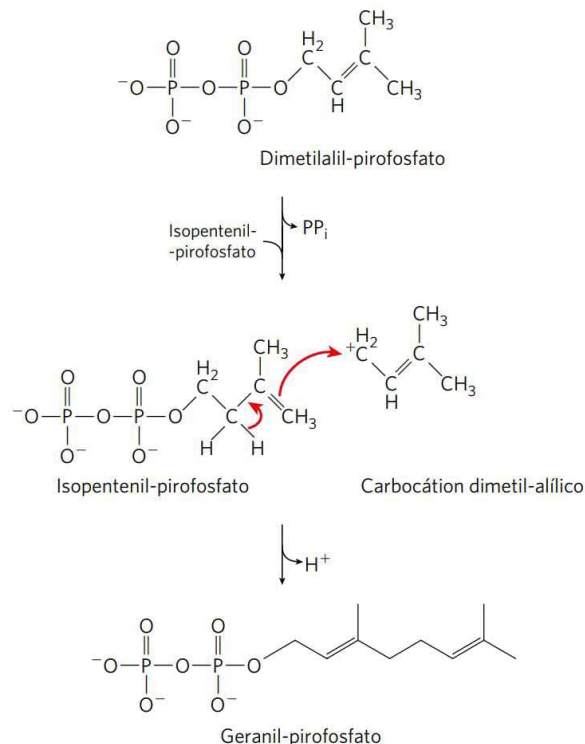
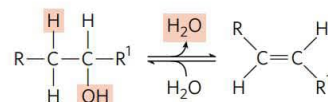


FIGURA 13-5 Os carbocátions na formação da ligação carbono-carbono. Em uma das primeiras etapas da biossíntese do colesterol, a enzima preniltransferase catalisa a condensação de isopentenil-pirofosfato e dimetil-pirofosfato, formando geranil-pirofosfato (ver Figura 21-36). A reação é iniciada pela eliminação do pirofosfato do dimetil-pirofosfato para gerar um carbocátion, estabilizado por ressonância com a ligação C=C adjacente.

-fosfato na glicólise (**Figura 13-6**; essa reação é discutida em detalhes no Capítulo 14): C-1 é reduzido (aldeído para álcool) e C-2 é oxidado (álcool para cetona). A Figura 13-6b mostra os detalhes dos movimentos dos elétrons neste tipo de isomerização. Um rearranjo *cis-trans* está ilustrado na reação da prolil-*cis-trans*-isomerase no enovelamento de certas proteínas (ver Figura 4-8). Uma simples mudança de uma ligação C=C ocorre durante o metabolismo do ácido oleico, um ácido graxo comum (ver Figura 17-10). Alguns exemplos espetaculares de reposicionamento de duplas ligações ocorrem na biossíntese do colesterol (ver Figura 21-33).

Um exemplo de uma reação de eliminação que não afeta o estado de oxidação global é a perda de água por um álcool, resultando na introdução de uma ligação C=C:



Reações similares podem resultar de eliminações em aminas.

Reações de radicais livres Anteriormente considerada rara, a clivagem homolítica de uma ligação covalente para gerar radicais livres é encontrada em uma ampla gama de processos bioquímicos. Alguns exemplos são: isomerizações que fazem uso de adenosilcobalamina (vitamina B₁₂) ou S-adenosilmetionina e são iniciadas com um radical 5-de-soxiadenosila (ver reação da metilmalonil-CoA-mutase no Quadro 17-2); certas reações de descarboxilação iniciadas por radicais (**Figura 13-7**); algumas reações da redutase, como a catalisada pela ribonucleotídeo-redutase (ver Figura 22-42); e algumas reações de rearranjo, como as catalisadas pela DNA-fotoliase (ver Figura 25-26).

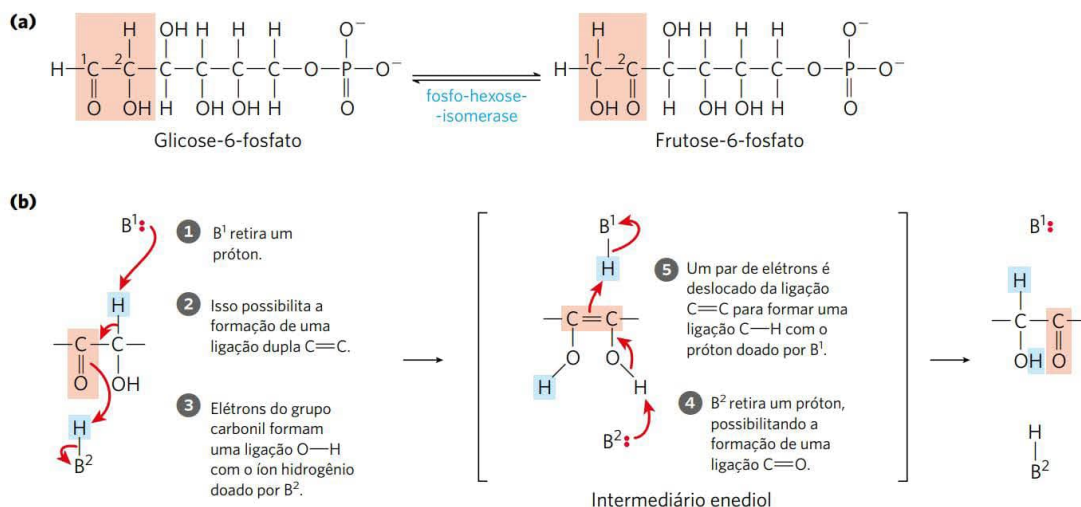


FIGURA 13-6 Reações de isomerização e eliminação. (a) Conversão de glicose-6-fosfato a frutose-6-fosfato, reação do metabolismo de açúcares catalisada pela fosfo-hexose-isomerase. (b) Esta reação ocorre por meio de um intermediário enediol. Os quadros em cor salmão indicam a via de oxidação da esquerda para a direita. B¹ e B² são grupos ionizáveis da enzima e são capazes de doar e aceitar prótons (atuando como ácidos gerais ou bases gerais) à medida que a reação ocorre.

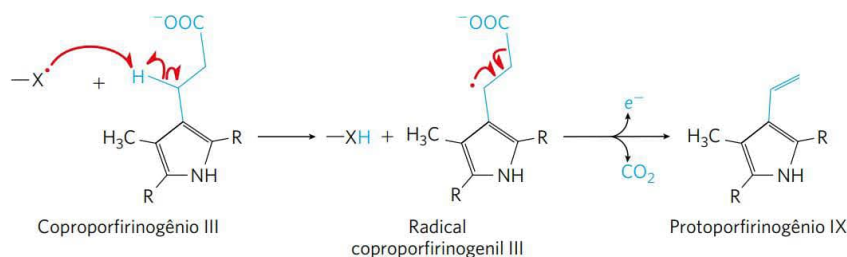
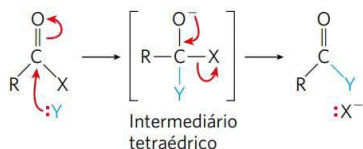


FIGURA 13-7 Uma reação de descarboxilação iniciada por radicais livres. A biossíntese do heme (ver Figura 22-26) em *Escherichia coli* inclui uma etapa de descarboxilação em que a cadeia lateral propionila do intermediário coproporfirinogênio III é convertida na cadeia lateral vinila do protoporfirinogênio IX. Quando a bactéria está crescendo anaerobicamente, a enzima, que não depende de oxigênio, coproporfirinogênio III-oxidase, também chamada de proteína HemN, promove a descarboxilação pelo mecanismo de radical livre mostrado aqui. O receptor do elétron liberado não é conhecido. Para simplificar, estão mostradas apenas as porções relevantes das moléculas grandes de coproporfirinogênio III e protoporfirinogênio; as estruturas completas são mostradas na Figura 22-26. Quando *E. coli* está crescendo na presença de oxigênio, esta reação é uma descarboxilação oxidativa, sendo catalisada por uma enzima diferente. [Fonte: Informação de G. Layer et al., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8:468, 2004, Fig. 4.]

Reações de transferência de grupos A transferência de grupos acila, glicosila e fosforila de um nucleófilo para outro é muito comum nas células. A transferência de grupo acila geralmente envolve a adição de um nucleófilo ao carbono de um grupo acila para formar um intermediário tetraédrico:



A reação da quimotripsina é um exemplo de transferência de grupo acila (ver Figura 6-23). A transferência de grupos glicosila envolve a substituição nucleofílica no C-1 do anel de um açúcar, que é o átomo central de um acetal. Em princípio, a substituição poderia prosseguir por via $\text{S}_{\text{N}}1$ ou $\text{S}_{\text{N}}2$, como descrito na Figura 6-29 para a enzima lisozima.

A transferência de grupos fosforila tem uma função especial nas vias metabólicas, e essas reações de transferência são discutidas em detalhes na Seção 13.3. Um tema geral no metabolismo é a ligação de um bom grupo de saída a um intermediário metabólico, a fim de “ativá-lo” para as reações subsequentes. Entre os melhores grupos de saída das reações de substituição nucleofílica estão o organofosfato (a forma ionizada do H_3PO_4 em pH neutro, uma mistura de H_2PO_4^- e HPO_4^{2-} , normalmente abreviada como P_i) e o pirofosfato inorgânico ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$, abreviado por PP_i); ésteres e anidridos do ácido fosfórico são ativados para a reação. A substituição nucleofílica torna-se mais favorável pela ligação de um grupo fosforila a um grupo de saída que de outra maneira seria pobre, como a hidroxila $-\text{OH}$. Em centenas de reações do metabolismo ocorrem substituições nucleofílicas nas quais o grupo fosforila ($-\text{PO}_3^{2-}$) serve como grupo de saída.

O fósforo pode formar cinco ligações covalentes. A representação convencional de P_i (Figura 13-8a), com três ligações $\text{P}-\text{O}$ e uma ligação $\text{P}=\text{O}$, é conveniente, mas não é acurada. No P_i , quatro ligações fósforo-oxigênio equivalentes compartilham parcialmente o caráter de ligação dupla, e o ânion tem uma estrutura tetraédrica (Figura 13-8b).

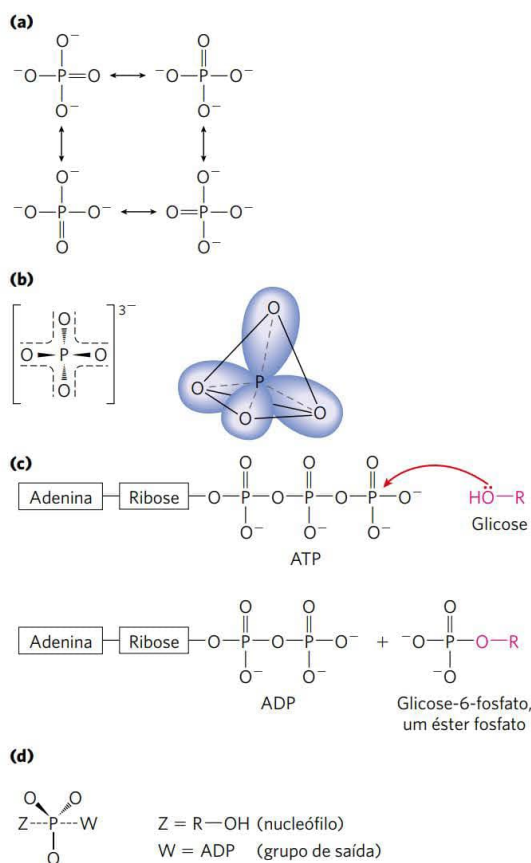


FIGURA 13-8 Alguns participantes na transferência de grupos fosforila. (a) Em uma representação (inadequada) do P_i , três oxigênios estão ligados por ligações simples ao fósforo e o quarto está ligado por ligação dupla, possibilitando as quatro estruturas de ressonância mostradas. (b) As estruturas de ressonância de P_i podem ser representadas mais acuradamente mostrando-se todas as quatro ligações fósforo-oxigênio com caráter de ligação dupla parcial; os orbitais híbridos assim representados estão arranjados em um tetraedro, com o P na posição central. (c) Quando um nucleófilo Z (neste caso, a $-\text{OH}$ do C-6 da glicose) ataca o ATP, ele desloca ADP (W). Nesta reação $\text{S}_{\text{N}}2$, há formação transiente de um (d) intermediário pentavalente.

Como o oxigênio é mais eletronegativo que o fósforo, o compartilhamento dos elétrons é desigual: o fósforo central fica com uma carga positiva parcial e, portanto, atua como um eletrófilo. Em uma enormidade de reações metabólicas, o grupo fosforila ($-\text{PO}_3^{2-}$) é transferido do ATP para um álcool, formando um éster de fosfato (Figura 13-8c), ou para um ácido carboxílico, formando um anidrido misto. Quando um nucleófilo ataca o átomo de fósforo eletrofilico do ATP, forma-se um intermediário de reação com uma estrutura pentacovalente relativamente estável (Figura 13-8d). Com a partida do grupo de saída (ADP), a transferência de um grupo fosforila está completa. A grande família de enzimas que catalisam a transferência de grupos fosforila, com o ATP como doador, é chamada de **cinase** (do grego, *kinein*, “mover”). A hexocinase, por exemplo, “move” um grupo fosforila do ATP para a glicose.

Os grupos fosforila não são os únicos grupos que ativam moléculas para reação. Os tioálcoois (tióis), em que o átomo de oxigênio de um álcool é substituído por um átomo de enxofre, também são bons grupos de saída. Os tióis ativam os ácidos carboxílicos pela formação de tioésteres (ou tiol ésteres). Em capítulos posteriores serão discutidas diversas reações, inclusive aquelas catalisadas pela acilgraxo-sintetase na síntese de lipídeos (ver Figura 21-2), em que a substituição nucleofílica no carbono do carbonila de um tioéster resulta na transferência do grupo acil para outra região.

Reações de oxidação-redução Os átomos de carbono podem existir em cinco estados de oxidação, dependendo dos elementos com que eles compartilham os elétrons (**Figura 13-9**), e as transições entre esses estados de oxidação são de importância crucial no metabolismo (as reações de oxidação-redução são o tópico da Seção 13.4). Em muitas oxidações biológicas, um composto perde dois elétrons e dois íons hidrogênio (i.e., dois átomos de hidrogênio). Essas reações são comumente chamadas de desidrogenações, e as enzimas que as catalisam são chamadas de desidrogenases (**Figura 13-10**). Em algumas oxidações biológicas, mas não em todas, um átomo de carbono é covalentemente ligado a um átomo de oxigênio. As enzimas que catalisam essas oxidações geralmente são chamadas de oxidases ou, se o átomo de oxigênio é derivado diretamente de um oxigênio molecular (O_2), oxidogenases.

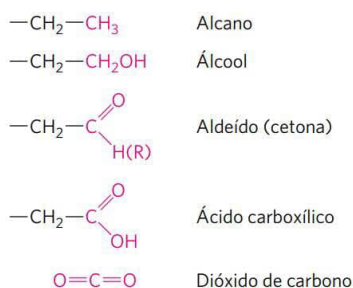


FIGURA 13-9 Níveis de oxidação do carbono nas biomoléculas. Cada composto é formado pela oxidação do carbono mostrado em vermelho no composto imediatamente anterior. O dióxido de carbono é a forma de carbono mais altamente oxidada encontrada nos sistemas vivos.

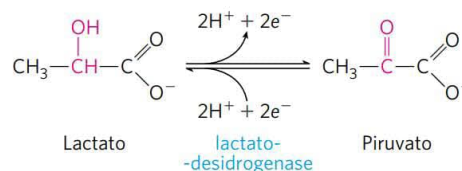


FIGURA 13-10 Uma reação de oxidação-redução. Está representada aqui a oxidação do lactato a piruvato. Nesta desidrogenação, dois elétrons e dois íons hidrogênio (o equivalente a dois átomos de hidrogênio) são removidos do C-2 do lactato, um álcool, formando piruvato, uma cetona. Nas células, a reação é catalisada pela lactato-desidrogenase, e os elétrons são transferidos para o cofator nicotinamida-adenina dinucleotídeo (NAD). Esta reação é totalmente reversível; o piruvato pode ser reduzido pela transferência dos elétrons do cofator.

Cada oxidação deve ser acompanhada por uma redução, na qual um receptor de elétrons recebe os elétrons removidos na oxidação. As reações de oxidação geralmente liberam energia (pense em uma fogueira: os compostos na madeira são oxidados por moléculas de oxigênio do ar). A maioria das células vivas obtém a energia necessária para o trabalho celular pela oxidação de combustíveis metabólicos, como carboidratos ou gorduras (os organismos fotossintéticos também podem captar e usar a energia da luz solar). As vias catabólicas (que liberam energia), descritas nos Capítulos 14 a 19, são sequências de reações oxidativas que resultam na transferência de elétrons das moléculas combustíveis para o oxigênio por meio de uma série de transportadores de elétrons. A alta afinidade do O_2 por elétrons torna o processo global de transferência de elétrons altamente exergônico, fornecendo energia que leva à síntese de ATP – o objetivo central do catabolismo.

Muitas das reações dessas cinco classes são facilitadas por cofatores, na forma de coenzimas e metais (vitamina B_{12} , *S*-adenosilmetionina, folato, nicotinamida e ferro são alguns exemplos). Os cofatores ligam-se às enzimas – em alguns casos reversivelmente, em outros casos quase irreversivelmente – e conferem a elas a capacidade de promover um tipo particular de reação química (p. 188). A maior parte dos cofatores participa em uma estreita faixa de reações diretamente relacionadas. Os capítulos seguintes apresentam e discutem cada cofator biologicamente importante. Os cofatores fornecem outra forma de organizar o estudo dos processos bioquímicos, já que as reações facilitadas por um determinado cofator costumam ser mecanisticamente relacionadas.

As equações bioquímicas e químicas não são idênticas

Os bioquímicos representam as equações metabólicas de forma simplificada e isso é particularmente evidente para as reações envolvendo ATP. Os compostos fosforilados podem existir em vários estados de ionização e, conforme já mencionado, as diferentes espécies podem ligar Mg^{2+} . Por exemplo, em pH 7 e Mg^{2+} 2 mM, ATP existe na forma de ATP^{4-} , HATP^{3-} , $\text{H}_2\text{ATP}^{2-}$, MgHATP^- e Mg_2ATP . Considerando a função biológica do ATP, no entanto, nem sempre há interesse em todos esses detalhes e, assim, considera-se o ATP como uma entidade constituída pela soma dessas espé-

cies e sua hidrólise é representada na forma de uma equação bioquímica



na qual ATP, ADP e P_i correspondem ao somatório das espécies. As correspondentes constantes de equilíbrio-padrão transformadas, $K'_{\text{eq}} = [\text{ADP}][\text{P}_i]/[\text{ATP}]$ dependem do pH e da concentração de Mg^{2+} livre. Observe que H^+ e Mg^{2+} não aparecem na equação bioquímica, pois são mantidos constantes. Portanto, uma equação bioquímica não inclui necessariamente o equilíbrio de H, Mg ou de cargas, embora ela inclua o equilíbrio entre todos os outros elementos envolvidos na reação (C, N, O e P na equação acima).

É possível escrever uma equação química que *inclua* o equilíbrio de todos os elementos e cargas. Por exemplo, quando o ATP é hidrolisado em valores de pH acima de 8,5 na ausência de Mg^{2+} , a reação química é representada por



A constante de equilíbrio correspondente depende apenas da temperatura, da pressão e da força iônica.

As duas formas de representação de equações metabólicas são relevantes na bioquímica. As equações químicas são utilizadas quando se quer levar em consideração todos os átomos e cargas envolvidos em uma reação, como, por exemplo, quando se estuda o mecanismo de uma reação química. As equações bioquímicas são utilizadas para determinar em qual sentido uma reação ocorrerá espontaneamente, dado um valor de pH e $[\text{Mg}^{2+}]$ específicos, ou para calcular a constante de equilíbrio da reação.

Ao longo deste livro, serão utilizadas equações bioquímicas, a menos que o foco seja o mecanismo da reação, e valores de $\Delta G'^{\circ}$ e K'_{eq} determinados em pH 7 e Mg^{2+} 1 mM.

RESUMO 13.2 Lógica química e reações bioquímicas comuns

- Os sistemas vivos fazem uso de um grande número de reações químicas que podem ser classificadas em cinco tipos gerais.
- Os grupos carbonila exercem função especial nas reações que formam ou clivam ligações C—C. Intermediários carbânions são comuns e estabilizados por grupos carbonila adjacentes ou, menos frequentemente, por grupos imino e certos cofatores.
- A redistribuição dos elétrons pode produzir rearranjos internos, isomerizações e eliminações. Essas reações incluem oxidação-redução intramolecular, alteração do arranjo *cis-trans* de ligações duplas e transposições de ligações duplas.
- A clivagem homolítica de ligações covalentes com a geração de radicais livres ocorre em algumas vias, como em certas reações de isomerização, descarboxilação, redutase e rearranjos.
- As reações de transferência de grupos fosforila são um tipo especialmente importante de transferência de grupos nas células, necessário para a ativação de moléculas para as reações que, de outra forma, seriam altamente desfavoráveis.

- As reações de oxidação-redução envolvem a perda ou o ganho de elétrons: um reagente ganha elétrons e é reduzido, ao passo que outro perde elétrons e é oxidado. As reações de oxidação geralmente liberam energia e são importantes no catabolismo.

13.3 Transferência de grupos fosforila e ATP

Uma vez apresentados alguns princípios fundamentais da variação de energia em sistemas químicos e revisadas as classes comuns de reações, agora é possível examinar o ciclo de energia nas células e a função especial do ATP como a moeda energética que relaciona catabolismo e anabolismo (ver Figura 1-30). As células heterotróficas obtêm energia livre de forma química pelo catabolismo de moléculas de nutrientes, e elas usam essa energia para fazer ATP a partir de ADP e P_i . O ATP, então, doa parte da sua energia química para processos endergônicos, como a síntese de intermediários metabólicos e de macromoléculas a partir de precursores menores, para o transporte de substâncias por meio de membranas contra gradientes de concentração e para o movimento mecânico. Essa doação de energia do ATP geralmente envolve que ele participe covalentemente na reação, com a eventual conversão de ATP em ADP e P_i , ou, em algumas reações, em AMP e 2 P_i . Agora, serão discutidas as bases químicas para a grande variação de energia livre que acompanha a hidrólise de ATP e de outros compostos de fosfato altamente energéticos e será mostrado que a maior parte dos casos de doação de energia por ATP envolve a transferência de grupo, e não simplesmente a hidrólise de ATP. Para ilustrar a gama de transduções de energia nas quais o ATP fornece a energia, será abordada a síntese de macromoléculas ricas em informação, o transporte de solutos através das membranas e o movimento produzido pela contração muscular.

A variação de energia livre para a hidrólise do ATP é grande e negativa

A **Figura 13-11** resume as bases químicas da energia livre padrão da hidrólise de ATP, relativamente grande e negativa. A hidrólise da ligação do anidrido do ácido fosfórico (fosfoanidrido) terminal do ATP separa um dos três fosfatos carregados negativamente, aliviando, assim, parte da repulsão eletrostática no ATP; o P_i liberado é estabilizado pela geração de formas de ressonância que não são possíveis no ATP.

A variação de energia livre para hidrólise de ATP é $-30,5$ kJ/mol em condições-padrão, mas a energia livre *real* da hidrólise do ATP (ΔG) em células vivas é muito diferente: as concentrações celulares de ATP, ADP e P_i não são idênticas e são muito mais baixas do que 1,0 M das condições-padrão (Tabela 13-5). Além disso, o Mg^{2+} no citosol liga ATP e ADP (**Figura 13-12**), sendo que, para a maioria das reações enzimáticas que envolve ATP como doador de grupo fosforila, o verdadeiro substrato é MgATP^{2+} . Portanto, o $\Delta G'^{\circ}$ relevante é o da hidrólise de MgATP^{2+} . Pode-se calcular o ΔG para a hidrólise de ATP usando os dados da Tabela 13-5. A energia livre real para a hidrólise de ATP nas condições intracelulares é geralmente chamada de **potencial de fosforilação, ΔG_p** .

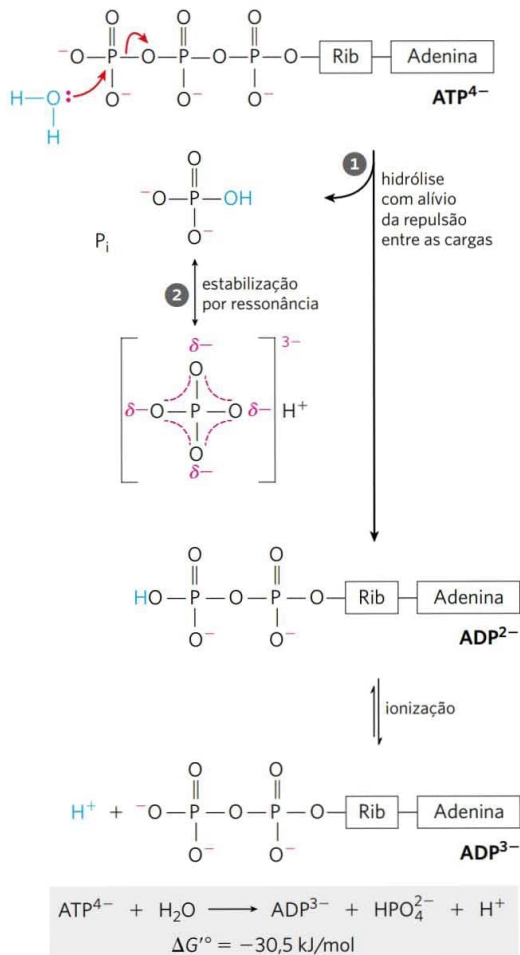


FIGURA 13-11 Bases químicas para a grande variação de energia livre associada à hidrólise de ATP. 1. A separação de cargas resultante da hidrólise atenua a repulsão eletrostática entre as quatro cargas negativas do ATP. 2. O fosfato inorgânico liberado (P_i) é estabilizado pela formação de um híbrido de ressonância, em que cada uma das quatro ligações fósforo-oxigênio apresenta o mesmo grau do caráter de ligação dupla e os íons hidrogênio não se encontram permanentemente associados a nenhum dos átomos de oxigênio. (Certo grau de estabilização por ressonância também ocorre nos fosfatos envolvidos nas ligações éster ou anidrido, mas em menor quantidade que no P_i.) Um terceiro fator (não mostrado) que favorece a hidrólise de ATP é o maior grau de solvatação (hidratação) dos produtos P_i e ADP em relação ao ATP, que proporciona uma estabilização adicional dos produtos em relação aos reagentes.

Como as concentrações de ATP, ADP e P_i são diferentes de um tipo de célula para outro, o ΔG_p do ATP também difere. Além disso, em qualquer célula, o ΔG_p pode variar ao longo do tempo, dependendo das condições metabólicas e de como elas influenciam as concentrações de ATP, ADP, P_i e H⁺ (pH). É possível calcular a variação de energia livre real para qualquer reação metabólica, nas condições em que ela ocorre na célula, desde que sejam conhecidas as concentrações de todos os reagentes e produtos da reação, além de outros fatores (como pH, temperatura e [Mg²⁺]) que podem afetar a variação de energia livre real.

TABELA 13-5 Concentrações totais de nucleotídeos da adenina, fosfato inorgânico e fosfocreatina de algumas células

	Concentração (mM) ^a				
	ATP	ADP ^b	AMP	P _i	PCr
Hepatócito de rato	3,38	1,32	0,29	4,8	0
Miócito de rato	8,05	0,93	0,04	8,05	28
Neurônio de rato	2,59	0,73	0,06	2,72	4,7
Eritrócito humano	2,25	0,25	0,02	1,65	0
Célula de <i>E. coli</i>	7,90	1,04	0,82	7,9	0

^aPara eritrócitos, as concentrações são aquelas do citosol (eritrócitos humanos não possuem núcleo e mitocôndria). Nos outros tipos celulares, os dados são para o conteúdo total da célula, embora o citosol e a mitocôndria possuam concentrações muito diferentes de ADP. PCr é fosfocreatina, discutida na página 516.

^bEste valor reflete a concentração total; o valor real de ADP livre deve ser muito menor (p. 509).

Para complicar mais ainda esse ponto, as concentrações *totais* de ATP, ADP e P_i (e H⁺) em uma célula – como os valores que estão mostrados na Tabela 13-5 – podem ser substancialmente maiores do que as concentrações *livres*, e esses são os valores termodinamicamente relevantes. A diferença deve-se à ligação forte de ATP, ADP e P_i a proteínas celulares. Por exemplo, a [ATP] livre no músculo em repouso, entre 1 e 37 μM, foi estimada de várias maneiras. Usando o valor 25 μM no Problema 13-2, pode-se chegar a um ΔG_p de -58 kJ/mol. Calcular o valor exato de ΔG_p , entretanto, é talvez menos instrutivo do que a generalização que pode ser feita sobre as variações de energia livre reais. *In vivo*, a energia liberada pela hidrólise de ATP é maior do que a variação de energia livre padrão, $\Delta G'^{\circ}$.

Na discussão a seguir, o valor de $\Delta G'^{\circ}$ será usado para a hidrólise do ATP, uma vez que isso permite comparações, nas mesmas bases, com a energética de outras reações celulares. Deve-se sempre ter em mente que, nas células, ΔG é a grandeza relevante para a hidrólise de ATP e todas as demais reações e que ela pode ser bem diferente de $\Delta G'^{\circ}$.

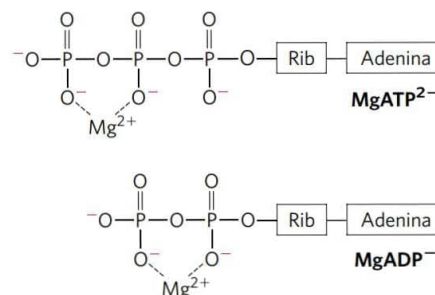


FIGURA 13-12 Mg²⁺ e ATP. A formação dos complexos com o Mg²⁺ isola parcialmente as cargas negativas e influencia a conformação dos grupos fosfato em nucleotídeos como ATP e ADP.

PROBLEMA 13-2 Cálculo de ΔG_p

Calcule a energia livre real para a hidrólise de ATP, ΔG_p , em eritrócitos humanos. A energia livre padrão para a hidrólise do ATP é $-30,5$ kJ/mol, e as concentrações de ATP, ADP e P_i nos eritrócitos estão mostradas na Tabela 13-5. Considere que o pH é 7,0 e a temperatura é 37°C (temperatura do corpo). O que isso revela sobre a quantidade de energia necessária para *sintetizar* ATP sob as mesmas condições celulares?

Solução: as concentrações de ATP, ADP e P_i em eritrócitos humanos são de 2,25, 0,25 e 1,65 mM, respectivamente. A energia livre real para a hidrólise do ATP sob essas condições é dada pela relação (ver Equação 13-4)

$$\Delta G_p = \Delta G'^{\circ} + RT \ln \frac{[\text{ADP}][P_i]}{[\text{ATP}]}$$

Substituindo os valores apropriados, obtém-se

$$\begin{aligned}\Delta G_p &= -30,5 \text{ kJ/mol} + \left[(8,315 \text{ kJ/mol} \cdot \text{K})(310 \text{ K}) \ln \frac{(0,25 \times 10^{-3})(1,65 \times 10^{-3})}{(2,25 \times 10^{-3})} \right] \\ &= -30,5 \text{ kJ/mol} + (2,58 \text{ kJ/mol}) \ln 1,8 \times 10^{-4} \\ &= -30,5 \text{ kJ/mol} + (2,58 \text{ kJ/mol})(-8,6) \\ &= -30,5 \text{ kJ/mol} - 22 \text{ kJ/mol} \\ &= -52 \text{ kJ/mol}\end{aligned}$$

(Observe que a resposta final foi arredondada para o número correto de dígitos significativos [52,5 arredondado para 52], de acordo com regras de arredondamento de números que terminam em 5 para o dígito inferior mais próximo.) Então, ΔG_p , a variação de energia livre real para a hidrólise de ATP em eritrócitos intactos (-52 kJ/mol) é muito maior do que a variação de energia livre padrão ($-30,5$ kJ/mol). Da mesma forma, a energia livre necessária para *sintetizar* ATP a partir de ADP e P_i , sob as condições que prevalecem nos eritrócitos, é 52 kJ/mol.

Agora, é preciso fazer uma observação importante sobre os níveis celulares de ATP. Foi mostrado (e será discutido adiante) como as propriedades químicas do ATP fazem dele uma forma conveniente de moeda de energia nas células. Contudo, não são meramente as propriedades químicas intrínsecas da molécula que dão ao ATP essa capacidade de direcionar as reações metabólicas e outros processos que requerem energia. Ainda mais importante é que, ao longo da evolução, ocorreu uma pressão de seleção muito forte a favor de mecanismos regulatórios que *mantêm as concentrações de ATP muito abaixo das concentrações de equilíbrio* da reação de hidrólise. Quando o nível de ATP diminui, não apenas a *quantidade* de combustível diminui, mas o combustível por si só *perde seu potencial*: a ΔG para hidrólise (i.e., o potencial de fosforilação, ΔG_p) diminui. Essa discussão sobre as vias metabólicas que produzem e consomem ATP mostrará que as células desenvolveram mecanismos elaborados – muitas vezes parecendo que à custa da eficiência – para manter as concentrações de ATP em níveis altos

Outros compostos fosforilados e tioésteres também apresentam energia livre de hidrólise elevada

O fosfoenolpiruvato (PEP; **Figura 13-13**) contém uma ligação éster-fosfato que sofre hidrólise para gerar a forma enó-

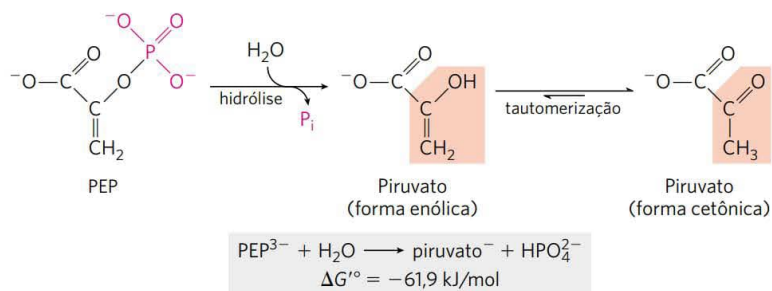
lica do piruvato, e esse produto direto pode tautomerizar, gerando a forma cetônica mais estável. Como o reagente (PEP) tem apenas uma forma (enol) e o produto (piruvato) contém duas formas possíveis, o produto é mais estável em relação ao reagente. Este é o fator que mais contribui para a elevada energia livre padrão de hidrólise do fosfoenolpiruvato: $\Delta G'^{\circ} = -6,9$ kJ/mol.

Outro composto de três carbonos, o 1,3-bisfosfoglicerato (**Figura 13-14**), possui uma ligação anidrido entre o grupo carboxila C-1 e o ácido fosfórico. A hidrólise desse acil-fosfato é acompanhada por uma variação de energia livre padrão grande e negativa ($\Delta G'^{\circ} = -49,3$ kJ/mol), que, novamente, pode ser explicada com base nas estruturas dos reagentes e produtos. Quando H_2O é adicionada à ligação anidrido do 1,3-bisfosfoglicerato, um dos produtos diretos, o ácido-3-fosfoglicérico, pode perder um próton, gerando um íon carboxilato, o 3-fosfoglicerato, o qual contém duas formas de ressonância igualmente prováveis (Figura 13-14). A remoção do produto direto (ácido 3-fosfoglicérico) e a formação do íon estabilizado por ressonância favorecem a reação no sentido direto.

Na fosfocreatina (**Figura 13-15**), a ligação P–N pode ser hidrolisada para gerar creatina livre e P_i . A liberação de P_i e a estabilização por ressonância da creatina favorecem a rea-

FIGURA 13-13 Hidrólise do fosfoenolpiruvato (PEP).

Catalisada pela piruvato-cinase, esta reação é seguida pela tautomerização espontânea do produto, o piruvato. Como não é possível haver tautomerização no PEP, os produtos da hidrólise são mais estáveis em relação aos reagentes. Também ocorre a estabilização por ressonância do P_i , como mostrado na Figura 13-11.



ção no sentido direto. A variação de energia livre padrão da hidrólise da fosfocreatina também é elevada, $-43,0 \text{ kJ/mol}$.

Em todas essas reações em que ocorre a liberação de fosfato, as várias formas de ressonância disponíveis para o P_i (Figura 13-11) estabilizam esse produto em relação ao reagente, contribuindo para uma variação de energia livre negativa. A Tabela 13-6 apresenta a energia livre padrão de hidrólise para alguns compostos fosforilados de importância biológica.

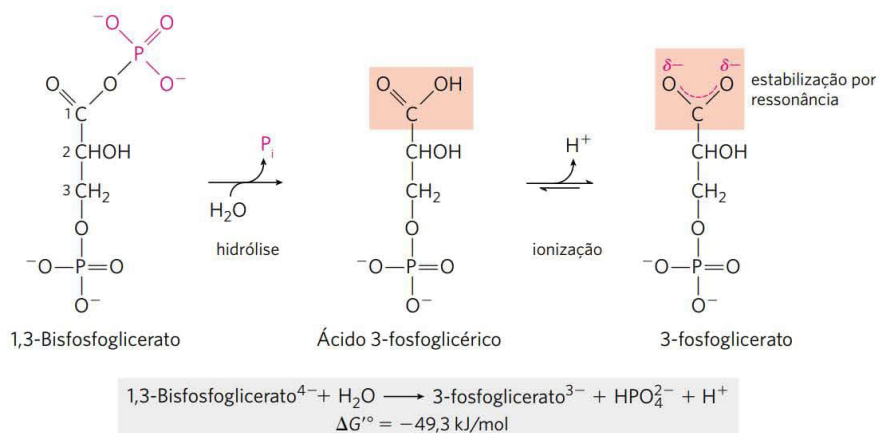
Os **tioésteres**, em que um átomo de enxofre substitui o oxigênio na ligação éster, também têm energia livre padrão de hidrólise elevada e negativa. A acetil-coenzima A, ou acetil-CoA (Figura 13-16), é um dos muitos tioésteres importantes no metabolismo. O grupo acila nesses compostos é ativado por reações de transacilação, condensação ou oxidação-redução. Os tioésteres sofrem muito menos estabilização por ressonância do que os ésteres de oxigênio. Como

consequência, a diferença de energia livre entre o reagente e os seus produtos de hidrólise que *são* estabilizados por ressonância é maior para os tioésteres do que para os ésteres de oxigênio relacionados (Figura 13-17). Em ambos os casos, a hidrólise do éster gera um ácido carboxílico que pode ionizar e assumir vários estados de ressonância. O conjunto desses fatores leva a que a hidrólise da acetil-CoA tenha um $\Delta G'^{\circ}$ grande e negativo ($-31,4 \text{ kJ/mol}$).

Em resumo, para as reações de hidrólise com variações de energia livre padrão elevadas e negativas, os produtos são mais estáveis do que os reagentes por uma, ou mais, das seguintes razões: (1) a tensão de ligação dos reagentes devida à repulsão eletrostática é aliviada pela separação de cargas, como no caso do ATP; (2) os produtos são estabilizados por ionização, como no ATP, nos acil-fosfatos e nos tioésteres; (3) os produtos são estabilizados por isomerização (tautomerização), como para o PEP; e/ou (4) os produtos

FIGURA 13-14 Hidrólise do 1,3-bisfosfoglicerato.

O produto direto da hidrólise é o ácido 3-fosfoglicérico, com um grupo ácido carboxílico não dissociado. A dissociação favorece as estruturas de ressonância que estabilizam o produto em relação aos reagentes. A estabilização por ressonância do P_i traz uma contribuição adicional à variação de energia livre negativa.

**FIGURA 13-15 Hidrólise da fosfocreatina.**

A quebra da ligação P—N na fosfocreatina produz creatina, que é estabilizada pela formação de um híbrido de ressonância. O outro produto, P_i , também é estabilizado por ressonância.

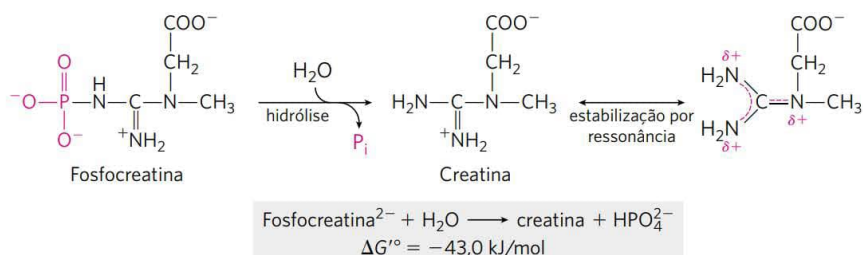


TABELA 13-6 Valores de energia livre padrão de hidrólise de alguns compostos fosforilados e da acetil-CoA (um tioéster)

	$\Delta G'^{\circ}$	
	(kJ/mol)	(kcal/mol)
Fosfoenolpiruvato-1,3-bisfosfoglicerato	-61,9	-14,8
1,3-Bisfosfoglicerato (\longrightarrow 3-fosfoglicerato + P_i)	-49,3	-11,8
Fosfocreatina	-43,0	-10,3
ADP (\longrightarrow AMP + P_i)	-32,8	-7,8
ATP (\longrightarrow ADP + P_i)	-30,5	-7,3
ATP (\longrightarrow AMP + PP_i)	-45,6	-10,9
AMP (\longrightarrow adenosina + P_i)	-14,2	-3,4
PP_i (\longrightarrow 2 P_i)	-19,2	-4,0
Glicose-3-fosfato	-20,9	-5,0
Frutose-6-fosfato	-15,9	-3,8
Glicose-6-fosfato	-13,8	-3,3
Glicerol-3-fosfato	-9,2	-2,2
Acetil-CoA	-31,4	-7,5

Fontes: dados de W. P. Jencks, em *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, 3ª ed. (G. D. Fasman, ed.), *Physical and Chemical Data*, Vol. 1, p. 296, CRC Press, 1976. Valor da energia livre da hidrólise de PP_i obtido de P. A. Frey e A. Arabshahi, *Biochemistry* 34:11,307, 1995.

são estabilizados por ressonância, como a creatina liberada da fosfocreatina, o íon carboxilato liberado do acil-fosfato e dos tioésteres e o fosfato (P_i) liberado das ligações anidrido ou éster.

O ATP fornece energia por transferência de grupos e não por simples hidrólise

Ao longo deste livro aparecem reações e processos para os quais o ATP fornece energia, e a contribuição do ATP para es-

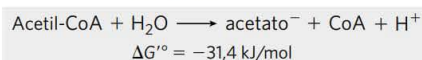
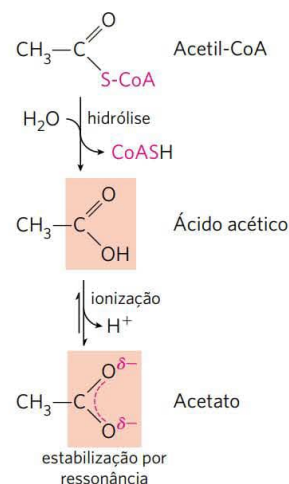


FIGURA 13-16 Hidrólise da acetil-coenzima A. A acetil-CoA é um tioéster com energia livre padrão de hidrólise elevada e negativa. Os tioésteres contêm um átomo de enxofre na posição ocupada por um átomo de oxigênio nos ésteres. A estrutura completa da coenzima A (CoA ou CoASH) está representada na Figura 8-41.

sas reações é comumente indicada como na **Figura 13-18a**, com uma seta simples mostrando a conversão de ATP em ADP e P_i (ou, em alguns casos, de ATP em AMP e pirofosfato, PP_i). Quando representadas dessa forma, essas reações de ATP parecem ser reações de hidrólise simples, nas qual a água desloca P_i (ou PP_i), e tendemos a dizer que as reações dependentes de ATP são “impulsionadas pela hidrólise do ATP”. Esse *não é* o caso. A hidrólise de ATP por si só geralmente faz nada mais do que liberar calor, que não pode impulsionar um processo químico em um sistema isotérmico. As reações representadas por setas simples, como aquela da Figura 13-18a, quase sempre indicam um processo em duas etapas (Figura 13-18b) em que parte da molécula de ATP, ou seja, um grupo fosforila ou pirofosforila ou a porção adenilil (AMP), é primeiro transferida para uma molécula de substrato ou para um resíduo de aminoácido de uma enzima, tor-

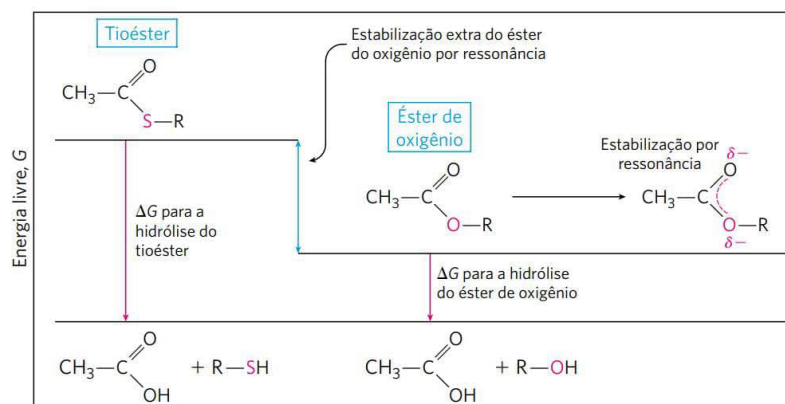


FIGURA 13-17 Energia livre de hidrólise para tioésteres e ésteres de oxigênio. Os produtos de ambos os tipos de reação de hidrólise têm aproximadamente o mesmo conteúdo de energia livre (G), mas o tioéster tem conteúdo de energia livre maior que o éster de oxigênio. A sobreposição de orbitais entre os átomos de O e C possibilita a estabilização por ressonância dos ésteres de oxigênio. A sobreposição de orbitais entre os átomos de S e C é pouco expressiva e gera pouca estabilização por ressonância.

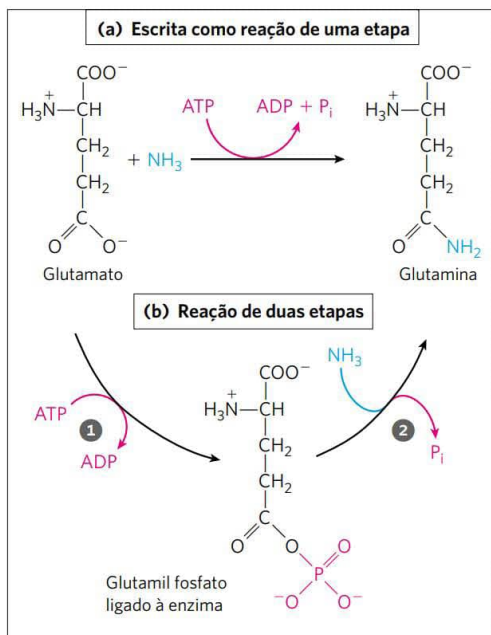


FIGURA 13-18 A hidrólise de ATP em duas etapas. (a) A contribuição do ATP para uma reação frequentemente é representada como etapa única, mas ela é quase sempre um processo em duas etapas. (b) Representação da reação catalisada pela glutamina-sintetase, enzima dependente de ATP. 1. Um grupo fosforil é transferido do ATP para o glutamato, e, então, 2. o grupo fosforil é deslocado pela NH_3 e P_i é liberado.

nando-se covalentemente ligada ao substrato ou à enzima, aumentando, dessa forma, seu conteúdo de energia livre. Então, em uma segunda etapa, a parte da molécula contendo o fosfato transferido na primeira etapa é deslocada, gerando P_i , PP_i , ou AMP como grupo de saída. Assim, o ATP participa *covalentemente* da reação enzimática, para a qual ele fornece energia livre.

No entanto, alguns processos *envolvem* a hidrólise direta do ATP (ou GTP). Por exemplo, a ligação não covalente de ATP (ou GTP), seguida da sua hidrólise a ADP (ou GDP) e P_i , pode fornecer a energia para promover a alternância de algumas proteínas entre duas conformações, produzindo movimento mecânico. Isso ocorre na contração muscular (ver Figura 5-31) e no movimento de enzimas ao longo do DNA (ver Figura 25-31) ou no deslocamento dos ribossomos ao longo do RNA mensageiro (ver Figura 27-31). As reações dependentes de energia catalisadas pelas helicases, proteína RecA e algumas topoisomerases (Capítulo 25) também envolvem a hidrólise direta de ligações fosfoanidridas. As AAA+ ATPases envolvidas na replicação do DNA e em outros processos descritos no Capítulo 25 usam a hidrólise do ATP para associar as proteínas envolvidas entre as formas ativa e inativa. As proteínas ligadoras de GTP, que agem em vias de sinalização, hidrolisam GTP diretamente para impulsionar mudanças conformacionais que extinguem sinais desencadeados por hormônios ou por outros fatores extracelulares (Capítulo 12).

Os compostos de fosfato encontrados nos seres vivos podem ser, um tanto arbitrariamente, divididos em dois grupos com base em suas energias livres padrão de hidrólise (**Figura 13-19**). Compostos de “alta energia” têm ΔG° de hidrólise mais do que -25 kJ/mol ; compostos de “baixa energia” têm um ΔG° menos negativo do que isso. Com base nesse critério, o ATP, com ΔG° de hidrólise de $-30,5 \text{ kJ/mol}$ ($-7,3 \text{ kcal/mol}$), é um composto de alta energia, e a glicose-6-fosfato, com ΔG° de hidrólise de $-13,8 \text{ kJ/mol}$ ($-3,3 \text{ kcal/mol}$), é um composto de baixa energia.

O termo “ligação fosfato de alta energia”, por muito tempo usado pelos bioquímicos para descrever a ligação $\text{P}-\text{O}$ quebrada em reações de hidrólise, é incorreto e enganoso, já que sugere erroneamente que a ligação por si mesma contém a energia. Na verdade, a quebra de todas as ligações químicas requer um *fornecimento* de energia. A energia livre liberada pela hidrólise de compostos de fosfato não vem da quebra da ligação especificamente; ela resulta dos produtos da reação com menor conteúdo de energia livre do que os reagentes. Para simplificar, algumas vezes será utilizado o termo “composto de fosfato de alta energia” em referência ao ATP ou a outro composto de fosfato com energia livre padrão de hidrólise elevada e negativa.

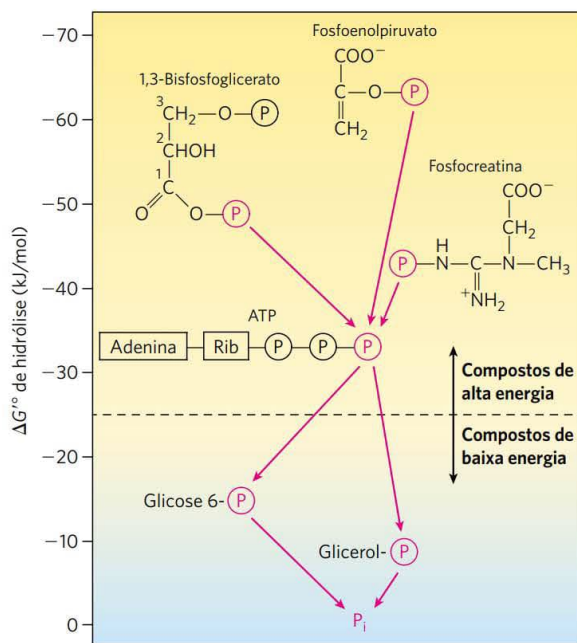
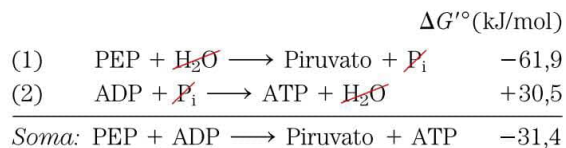


FIGURA 13-19 Classificação dos compostos de fosfato biológicos por energia livre padrão de hidrólise. A figura apresenta os grupos fosforil, representados por (P), partindo de doadores de grupo fosforil de alta energia, passando por ATP, até moléculas receptoras (como glicose e glicerol), formando os respectivos derivados fosfatados de baixa energia. (A posição de cada composto doador de grupo fosforil na escala é um indicativo aproximado do ΔG° composto da hidrólise.) Este fluxo de grupos fosforil, catalisado pelas cinases, ocorre com uma perda global de energia livre em condições intracelulares. A hidrólise de compostos de fosfato de baixa energia libera P_i , que apresenta um potencial de transferência de grupo fosforil ainda menor (conforme definido no texto).

Como as variações de energia livre das reações que ocorrem sequencialmente são aditivas (ver Seção 13.1), qualquer composto fosforilado pode ser sintetizado acoplado-se essa reação de síntese à quebra de outro composto fosforilado com uma energia livre de hidrólise mais negativa. Por exemplo, como a clivagem de P_i a partir de fosfoenolpiruvato libera mais energia do que o necessário para impulsionar a condensação de P_i com ADP, a doação direta de um grupo fosforila de PEP para ADP é termodinamicamente possível:



Observe que, enquanto a reação global está representada como a soma algébrica das duas primeiras reações, na realidade essa é uma terceira reação distinta que não envolve P_i ; o PEP doa um grupo *fosforila diretamente* ao ADP. Os compostos fosforilados são dotados de alto ou baixo *potencial de transferência de grupo fosforila* com base na respectiva energia livre padrão de hidrólise (como listado na Tabela 13-6). O potencial de transferência do grupo fosforila do PEP é muito elevado, o do ATP é elevado e o da glicose-6-fosfato é baixo (Figura 13-19).

Uma grande parte do catabolismo é direcionada para a síntese de compostos de fosfato de alta energia, mas sua formação não é um objetivo em si; eles são os meios para a ativação de uma ampla variedade de compostos utilizados nas reações químicas subsequentes. A transferência de um grupo fosforila a um composto agrega, efetivamente, energia livre a este, de modo que ele passa a ter mais energia livre para liberá-la durante as transformações químicas subsequentes. Antes foi descrito como a síntese de glicose-6-fosfato está associada à transferência de grupo fosforila do ATP. O próximo capítulo mostra como essa fosforilação da glicose ativa, ou “prepara”, a glicose para as reações catabólicas que ocorrem em praticamente todas as células vivas. Devido à posição intermediária que o ATP ocupa nesta escala de potencial de transferência, ele pode carrear a energia de compostos fosforilados de alta energia produzidos no catabolismo (p. ex., fosfoenolpiruvato) para compostos como a glicose, convertendo-os em espécies mais reativas e com melhores grupos de saída. Assim, o ATP serve como a moeda universal de energia em todas as células vivas.

Outra característica química do ATP é crucial para sua função no metabolismo: embora em solução aquosa o ATP seja termodinamicamente instável e, portanto, um bom doador de grupos fosforila, ele é *cineticamente* estável. Devido à enorme energia de ativação (200 a 400 kJ/mol) necessária para a clivagem não enzimática da sua ligação fosfoanidrido, o ATP não é capaz de doar espontaneamente grupos fosforila para a água ou para as centenas de outras potenciais moléculasceptoras na célula. A transferência dos grupos fosforila do ATP ocorre somente na presença de enzimas es-

pecíficas para reduzir a energia de ativação. A célula é, portanto, capaz de regular a disponibilidade de energia transportada pelo ATP por meio da regulação das várias enzimas que atuam sobre ele.

O ATP doa grupos fosforila, pirofosforila e adenilila

As reações do ATP geralmente são substituições nucleofílicas S_N2 (ver Seção 13.2) em que o nucleófilo pode ser, por exemplo, o oxigênio de um álcool ou de um carboxilato, ou um nitrogênio da creatina ou da cadeia lateral de arginina ou histidina. Os três fosfatos do ATP são suscetíveis ao ataque nucleofílico (**Figura 13-20**), e cada posição de ataque resulta em um tipo diferente de produto.

O ataque nucleofílico por um álcool sobre o fosfato γ (Figura 13-20a) desloca ADP e produz um novo éster-fosfato. Estudos realizados com reagentes marcados com ^{18}O mostraram que a ponte de oxigênio no novo composto é derivada do álcool, e não do ATP. O grupo transferido do ATP é, portanto, a fosforila ($-PO_3^{2-}$), e não o fosfato ($-OPO_3^{2-}$). A transferência de grupos fosforila do ATP para o glutamato (Figura 13-18) ou para a glicose (p. 219) envolve um ataque na posição γ da molécula de ATP.

O ataque sobre o fosfato β do ATP desloca AMP e transfere um grupo pirofosforila (não pirofosfato) para o nucleófilo atacante (Figura 13-20b). Por exemplo, a formação de 5-fosforribosil-1-pirofosfato (p. 870), um intermediário-chave na síntese dos nucleotídeos, é resultante do ataque de uma $-OH$ da ribose sobre um fosfato β .

O ataque nucleofílico na posição α do ATP desloca PP_i e transfere adenilil ($5'-AMP$) como um grupo adenilila (Figura 13-20c); essa reação é uma **adenililação** (a-den'-i-li-la'-qualquer coisa, é uma das palavras mais deselegantes da linguagem bioquímica). Observe que a hidrólise da ligação fosfoanidrido α - β libera uma quantidade de energia consideravelmente maior (~ 46 kJ/mol) do que a hidrólise da ligação β - γ (~ 31 kJ/mol) (Tabela 13-6). Além disso, o PP_i formado como subproduto da adenililação é hidrolisado a dois P_i pela enzima ubíqua **pirofosfatase inorgânica**, liberando 19 kJ/mol e fornecendo, portanto, energia adicional de “arranque” para a reação de adenililação. De fato, as duas ligações fosfoanidrido do ATP são rompidas na reação global. As reações de adenililação são, portanto, termodinamicamente muito favoráveis. Quando a energia do ATP é utilizada para promover uma reação metabólica particularmente desfavorável, a adenililação com frequência é o mecanismo de acoplamento de energia. A ativação de ácidos graxos é um bom exemplo dessa estratégia de acoplamento de energia.

A primeira etapa na ativação de um ácido graxo, seja para a oxidação com geração de energia ou para o uso na síntese de lipídeos mais complexos, é a formação de seu éster tiol (ver Figura 17-5). A condensação direta de um ácido graxo com a coenzima A é endergônica, mas a formação da acil-CoA graxo torna-se exergônica pela remoção sequencial de *dois* grupos fosforila do ATP. Primeiro, o adenilil (AMP) é transferido do ATP para o grupo carboxila do ácido graxo, formando um anidrido misto (acil-graxo-adenilil) e liberando PP_i . O grupo tiol da coenzima A, então, desloca o grupo

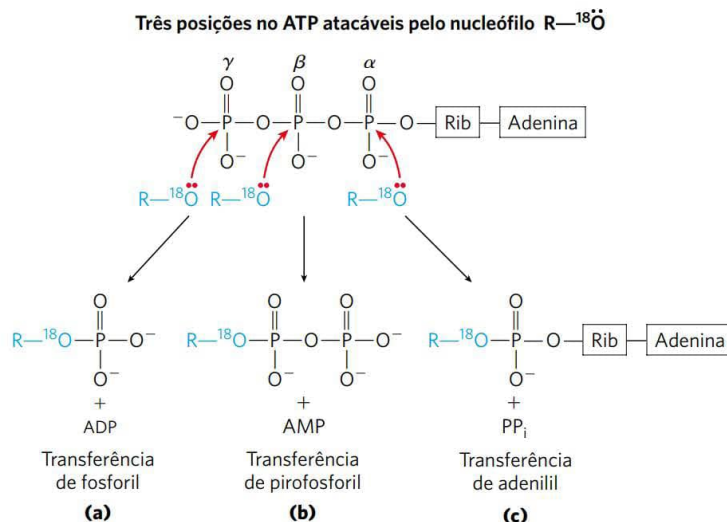
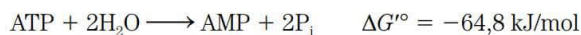


FIGURA 13-20 Reações de deslocamento nucleofílico do ATP. Qualquer dos átomos de P (α , β ou γ) pode servir de alvo para um ataque nucleofílico, nesse caso pelo nucleófilo marcado R—¹⁸O: O nucleófilo pode ser um álcool (ROH), um grupo carboxílico (RCOO⁻) ou um fosfoanidrido (p. ex., um nucleosídeo monofosfato ou difosfato). **(a)** Quando o oxigênio do nucleófilo ataca a posição γ , a ponte de oxigênio no produto fica marcada, indicando que o grupo transferido do ATP foi uma fosforila (—PO_3^{2-}), e não um fosfato (—OPO_3^{2-}). **(b)** O ataque na posição β desloca AMP e leva à transferência de um grupo pirofosforila (não pirofosfato) para o nucleófilo. **(c)** O ataque na α desloca PP_i e transfere o grupo adenilila para o nucleófilo.

adenilila e forma um tioéster com o ácido graxo. A soma das duas reações é energeticamente equivalente à hidrólise exergônica de ATP a AMP e PP_i ($\Delta G'^{\circ} = -45,6 \text{ kJ/mol}$) e a formação endergônica de acilgraxo-CoA. A formação de acil-graxo-CoA ($\Delta G'^{\circ} = -31,4 \text{ kJ/mol}$) torna-se energeticamente favorável devido à hidrólise de PP_i pela pirofosfatase inorgânica. Assim, na ativação de um ácido graxo, as duas ligações fosfoanidrido do ATP são rompidas. A $\Delta G'^{\circ}$ resultante é a soma dos valores de $\Delta G'^{\circ}$ da quebra dessas ligações, ou $-45,6 \text{ kJ/mol} + (-19,2) \text{ kJ/mol}$:



A ativação de aminoácidos que antecede a sua polimerização em proteínas (ver Figura 27-19) é realizada por um grupo análogo de reações em que a coenzima A é substituída por uma molécula de RNA de transferência. Uma utilização interessante da clivagem de ATP em AMP e PP_i ocorre no vaga-lume, que utiliza ATP como fonte de energia para a produção de lampejos de luz (Quadro 13-1).

A montagem de macromoléculas informacionais requer energia

Quando precursores simples se reúnem, formando polímeros de alta massa molecular com sequências definidas (DNA, RNA, proteínas), como descrito em detalhes na Parte III, é necessária energia tanto para a condensação das unidades monoméricas quanto para a criação de sequências *ordenadas*. Os precursores para a síntese de DNA e RNA são os nucleosídeos-trifosfato, e a polimerização é acompanhada pela clivagem da ligação fosfoanidrido entre os fosfatos α e β , com a liberação de PP_i (Figura 13-20). As unidades monoméricas transferidas para o polímero em crescimento

nessas reações são adenilil (AMP), guanilato (GMP), citidilato (CMP) ou uridilato (UMP) para a síntese de RNA e seus análogos desóxi (com TMP no lugar de UMP) para a síntese de DNA. Como mencionado anteriormente, a ativação dos aminoácidos para a síntese de proteínas envolve a doação de grupos adenilila do ATP, e o Capítulo 27 mostra que várias etapas da síntese de proteínas no ribossomo também são acompanhadas pela hidrólise de GTP. Em todos esses casos, a quebra exergônica de um nucleosídeo-trifosfato está acoplada ao processo endergônico de sintetizar um polímero com sequência específica.

O ATP fornece energia para o transporte ativo e a contração muscular

O ATP é capaz de fornecer energia para transportar um íon ou uma molécula através de uma membrana para outro compartimento aquoso, onde sua concentração é mais elevada (ver Figura 11-36). Os processos de transporte são os principais consumidores de energia; nos rins e no cérebro humano, por exemplo, dois terços da energia consumida quando em repouso são usados para bombear Na⁺ e K⁺ através da membrana plasmática por meio da Na⁺K⁺-ATPase. O transporte de Na⁺ e K⁺ é movido por fosforilação e desfosforilação cíclica da proteína transportadora, sendo o ATP o doador de grupo fosforila. A fosforilação dependente de Na⁺ da Na⁺K⁺-ATPase induz uma alteração na conformação da proteína, e a desfosforilação dependente de K⁺ favorece o retorno à conformação original. Cada ciclo no processo de transporte resulta na conversão de ATP em ADP e P_i, sendo que a variação da energia livre da hidrólise do ATP é responsável pelas alterações cíclicas na conformação da proteína que resultam no bombeamento eletrogênico de Na⁺ e K⁺.

QUADRO 13-1 O piscar do vaga-lume: notícias brilhantes sobre o ATP

A bioluminescência requer uma quantidade considerável de energia. No vaga-lume, o ATP é utilizado em um conjunto de reações que convertem energia química em energia luminosa. Os machos emitem um piscar de luz para atrair as fêmeas, que piscam de volta para mostrar interesse. Em 1950, a partir de milhares de vaga-lumes coletados por crianças em Baltimore e arredores, William McElroy e colaboradores da Universidade Johns Hopkins isolaram os principais componentes bioquímicos: a luciferina (ácido carboxílico complexo) e a luciferase (enzima). A geração de um lampejo de luz requer a ativação de luciferina por uma reação enzimática envolvendo a clivagem de pirofosfato do ATP para formar luciferil-adenilil (Figura Q-1). Na presença de oxigênio molecular e luciferase, a luciferina sofre descarboxilação oxidativa, um

processo em várias etapas, formando oxiluciferina. Esse processo é acompanhado pela emissão de luz. A cor da luz é diferente de uma espécie de vaga-lume para outra e parece ser determinada por diferenças na estrutura da luciferase. A luciferina é regenerada a partir da oxiluciferina, em uma série de reações subsequentes.

No laboratório, a luciferina e a luciferase purificadas de vaga-lume são utilizadas para medir quantidades muito pequenas de ATP por meio da intensidade de luz produzida. Uma quantidade ínfima como (10^{-12} mol) de ATP pode ser medida desse jeito. A técnica de pirosequenciamento de DNA é baseada em *flashes* de luz originários da reação da luciferina-luciferase para detectar a presença de ATP após a adição de nucleotídeos a uma fita de DNA em crescimento (Ver Figura 8-36).



O vagalume, um coleóptero da família *Lampyridae*.
[Fonte: Cathy Keifer/Fotolia.]

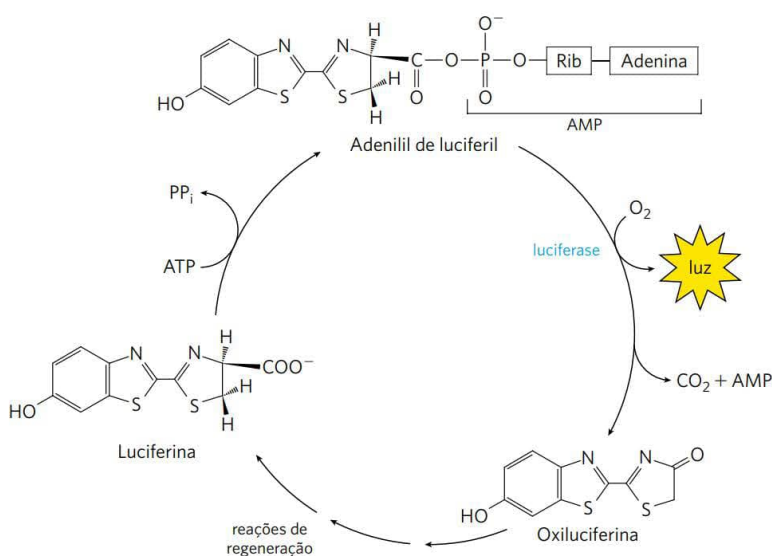


FIGURA Q-1 Componentes importantes no ciclo de bioluminescência do vagalume.

Observe que, nesse caso, o ATP interage covalentemente pela transferência de grupo fosforila para a enzima, e não para o substrato.

No sistema contrátil das células do músculo esquelético, a miosina e a actina são proteínas especializadas em transduzir a energia química do ATP em movimento (ver Figura 5-31). O ATP liga-se fortemente, mas não covalentemente, a uma determinada conformação da miosina, mantendo a proteína nessa conformação. Quando a miosina catalisa a hidrólise do ATP ligado, ADP e P_i dissociam-se, permitindo o relaxamento da proteína em uma segunda conformação até que outra molécula de ATP se ligue. A ligação e a subsequente hidrólise do ATP (pela miosina-ATPase) fornecem a energia que impulsiona as mudanças cíclicas na conformação da cabeça de miosina. A variação na conformação de

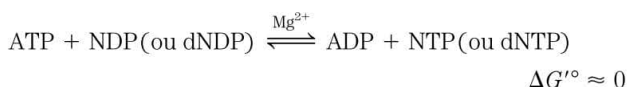
muitas moléculas de miosina individuais resulta no deslizamento das fibras de miosina ao longo dos filamentos de actina (ver Figura 5-30), o que leva à contração macroscópica da fibra muscular. Como mencionado anteriormente, essa produção de movimento mecânico com o gasto de ATP é um dos poucos casos em que a hidrólise de ATP por si, e não a transferência de grupos do ATP, é a fonte da energia química em um processo acoplado.

Transfosforilações entre nucleotídeos ocorrem em todos os tipos de células

Embora o ATP tenha sido focalizado como a moeda energética da célula e o doador de grupos fosforila, todos os outros nucleosídeos-trifosfato (GTP, UTP e CTP) e todos os

desoxinucleotídeos-trifosfato (dATP, dGTP, dTTP e dCTP) são energeticamente equivalentes ao ATP. As variações de energia livre padrão associadas à hidrólise dessas ligações fosfoanídrida são praticamente idênticas àsquelas do ATP, mostradas na Tabela 13-6. Na preparação para as suas diferentes funções biológicas, esses outros nucleotídeos são gerados e mantidos na forma de nucleosídeos-trifosfato (NTP) por transferência de grupo fosforila aos nucleosídeos-difosfato (NDP) e nucleosídeos-monofosfato (NMP) correspondentes.

O ATP é o principal composto de fosfato de alta energia produzido pelo catabolismo nos processos de glicólise, fosforilação oxidativa e, nas células fotossintéticas, fotofosforilação. Diversas enzimas são capazes de transportar grupos fosforila do ATP para outros nucleosídeos. A **nucleosídeo-difosfato-cinase**, encontrada em todas as células, catalisa a reação



Embora essa reação seja totalmente reversível, a relação [ATP]/[ADP] relativamente alta nas células geralmente impulsiona a reação para a direita, com a formação líquida de NTP e dNTP. Na verdade, a enzima catalisa a transferência de grupo fosforila em duas etapas, constituindo um exemplo clássico de um mecanismo de deslocamento duplo (pingue-pongue) (Figura 13-21; ver também Figura 6-13b). Primeiro, a transferência de um grupo fosforila do ATP ao resíduo de P-His do sítio ativo gera um intermediário fosfoenzima, e, a seguir, o grupo fosforila é transferido do resíduo de His para um receptor NDP. Como a enzima não é específica para a base do NDP e funciona igualmente bem sobre dNDP e NDP, ela pode sintetizar todos os NTP e dNTP, desde que sejam fornecidos os NDP correspondentes e uma fonte de ATP.

A transferência de grupos fosforila do ATP resulta em um acúmulo de ADP; por exemplo, quando o músculo está contraindo vigorosamente, o ADP acumula-se e interfere com a contração dependente de ATP. Durante períodos de intensa demanda por ATP, a célula reduz a concentração de ADP e, ao mesmo tempo, repõe ATP pela ação da **adenilil-cinase**:

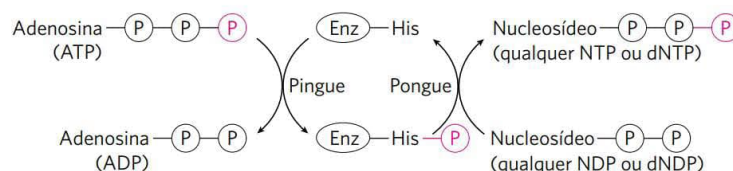
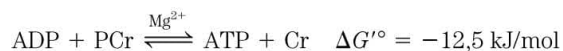


FIGURA 13-21 O mecanismo pingue-pongue da nucleosídeo-difosfato-cinase. A enzima liga seu primeiro substrato (ATP, nesse exemplo), e um grupo fosforila é transferido para a cadeia lateral de um resíduo de His. O ADP sai e outro nucleosídeo (ou desoxinucleosídeo)-difosfato o substitui, sendo, assim, convertido no trifosfato correspondente pela transferência do grupo fosforila do resíduo de fosfoenzima.

Esta reação é totalmente reversível, de modo que, após o término da demanda intensa por ATP, a enzima pode reciclar AMP, convertendo-o em ADP, que pode ser, então, fosforilado a ATP na mitocôndria. Uma enzima semelhante, a guanilato-cinase, converte GMP em GDP com gasto de ATP. Por meio de vias como essas, a energia conservada na produção catabólica de ATP é utilizada para suprir a célula com todos os NTP e dNTP necessários.

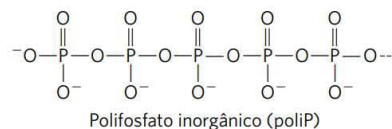
A fosfocreatina (PCr; Figura 13-15), também chamada de creatina-fosfato, atua como uma fonte imediata de grupos fosforila para a síntese rápida de ATP a partir de ADP. A concentração de PCr no músculo esquelético é aproximadamente de 30 mM, concentração quase 10 vezes maior do que a concentração de ATP. Em outros tecidos, como músculo liso, cérebro e rins, a [PCr] é de 5 a 10 mM. A enzima **creatina-cinase** catalisa a reação reversível



Quando uma súbita demanda por energia esgota o ATP, o reservatório de PCr é utilizado para a reposição de ATP a uma velocidade consideravelmente maior do que a síntese de ATP pelas vias catabólicas. Quando a demanda por energia diminui, o ATP produzido por catabolismo é utilizado para reconstituir o reservatório de PCr pela reação inversa da creatina-cinase (ver Quadro 23-2). Os organismos inferiores utilizam outras moléculas semelhantes à PCr (coletivamente chamadas de **fosfágenos**) como reservatórios de grupos fosforila.

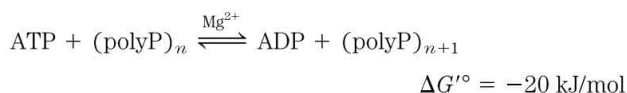
O polifosfato inorgânico é um doador potencial de grupo fosforila

O polifosfato inorgânico, poliP (ou $[\text{poliP}]_n$, no qual n é o número de resíduos ortofosfatos) é um polímero linear, composto de dezenas ou centenas de resíduos de P_i ligados por meio de ligações fosfoanídrido. Esse polímero, presente em todos os organismos, pode acumular-se em níveis elevados em algumas células. Em leveduras, por exemplo, a quantidade de poliP acumulada nos vacúolos representaria, se distribuída uniformemente por toda a célula, uma concentração de 200 M. (Comparar com as concentrações de outros doadores de grupos fosforila listados na Tabela 13-5.)

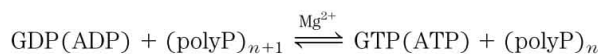


Um possível papel para o poliP é o de servir aos polifosfatos como fosfágeno, um reservatório de grupos fosforila que pode ser usado para gerar ATP da mesma maneira que a creatina-fosfato é usada pelo músculo. O poliP tem, aproximadamente, o mesmo potencial de transferência de grupo fosforila que o PP_i . O polifosfato mais curto, PP_i ($n = 2$), pode atuar como fonte de energia para o transporte ativo de H^+ através da membrana do vacúolo em células vegetais. PP_i é o doador de grupo fosforila para pelo menos uma forma da enzima fosfofrutocinase em plantas, uma função exercida por ATP em animais e micróbios (p. 540). A descoberta de altas concentrações de poliP em condensados vulcânicos e em fontes de vapor sugere que ele pode ter servido como fonte de energia em tempos prebióticos e na evolução celular inicial.

Em bactérias, a enzima **polifosfato-cinase 1** (PPK-1) catalisa a reação reversível



por um mecanismo envolvendo um intermediário fosfo-histidina ligado à enzima (retomar o mecanismo da nucleosídeo-difosfato-cinase, descrito na Figura 13-21). Uma segunda enzima, a **polifosfato-cinase 2** (PPK-2), catalisa a síntese reversível de GTP (ou ATP) a partir de polifosfato e GDP (ou ADP):



Imagina-se que a PPK-2 atue principalmente no sentido da síntese de GTP e ATP, e que a PPK-1 atue no sentido da síntese do polifosfato. PPK-1 e PPK-2 estão presentes em uma ampla variedade de bactérias, incluindo muitas espécies patogênicas.

Foi mostrado que, em bactérias, os elevados níveis de polifosfato promovem a expressão de genes envolvidos na adaptação a condições de jejum e outras ameaças à sobrevivência. Em *Escherichia coli*, por exemplo, ocorre acúmulo de poliP quando as células estão carentes de aminoácidos ou P_i , o qual confere uma vantagem de sobrevivência. A deleção dos genes que codificam as polifosfatos-cinase reduz a capacidade de certas bactérias patogênicas de invadir tecidos animais. Essas enzimas podem, portanto, ser alvos adequados no desenvolvimento de novos antibióticos.

Nenhum gene de levedura codifica para proteínas do tipo PPK, mas uma proteína relacionada com actina pode fazer a síntese de polifosfato. O mecanismo de síntese do polifosfato em eucariotos parece ser bem diferente daquele das bactérias.

RESUMO 13.3 Transferência de grupos fosforila e ATP

- O ATP é a conexão química entre catabolismo e anabolismo. Ele é a moeda energética das células vivas. A conversão exergônica de ATP em ADP e P_i , ou em AMP e PP_i , está acoplada a muitas reações e processos endergônicos.

- A hidrólise direta de ATP é a fonte de energia em alguns processos impulsionados por mudanças conformacionais, porém, em geral, não é a hidrólise de ATP, e sim a transferência de um grupo fosforila, pirofosforila ou adenilila do ATP a um substrato ou a uma enzima que acopla a energia da quebra do ATP às transformações endergônicas de substratos.
- Por meio dessas reações de transferência de grupo, o ATP fornece energia para as reações anabólicas, incluindo a síntese de macromoléculas informacionais, e para o transporte de moléculas e íons através das membranas contra gradientes de concentração e de potencial elétrico.
- Para manter um elevado potencial de transferência de grupos, a concentração de ATP deve ser mantida muito acima da concentração de equilíbrio das reações geradoras de energia do catabolismo.
- As células contêm outros metabólitos com energia livre de hidrólise elevada e negativa, incluindo fosfoenolpiruvato, 1,3-bisfosfoglicerato e fosfocreatina. Esses compostos de alta energia, como o ATP, possuem elevado potencial de transferência de grupos fosforila. Os tioésteres também possuem elevada energia livre de hidrólise.
- O polifosfato inorgânico, presente em todas as células, pode atuar como um reservatório de grupos fosforila com elevado potencial de transferência de grupos.

13.4 Reações biológicas de oxidação-redução

A transferência de grupos fosforila é uma característica central do metabolismo. Outro tipo de transferência é igualmente importante: a transferência de elétrons em reações de oxidação-redução, às vezes chamada de reações *redox*. Essas reações envolvem a perda de elétrons por uma espécie química, que é oxidada, e o ganho de elétrons por outra espécie, que é reduzida. O fluxo de elétrons nas reações de oxidação-redução é responsável, direta ou indiretamente, por todo o trabalho realizado por organismos vivos. Em organismos não fotossintéticos, as fontes de elétrons são os compostos reduzidos (alimentos); em organismos fotossintéticos, o doador de elétrons inicial é uma espécie química excitada pela absorção de luz. O caminho do fluxo de elétrons no metabolismo é complexo. Os elétrons movem-se de diferentes intermediários metabólicos para transportadores de elétrons especializados, em reações catalisadas enzimaticamente. Os transportadores, por sua vez, doam elétrons para receptores com afinidade maior por elétrons, com a liberação de energia. As células contêm uma grande variedade de transdutores moleculares de energia, que convertem a energia do fluxo de elétrons em trabalho útil.

Agora, será discutido como o trabalho pode ser realizado por uma força eletromotriz, considerando, em seguida, as bases teóricas e experimentais para medir as variações de energia em reações de oxidação, em termos de força eletromotriz e a relação entre essa força, expressa em volts, e a

variação de energia livre, expressa em joules. Para finalizar, serão descritas as estruturas e a química da oxidação-redução dos transportadores especializados de elétrons mais comuns, os quais retornarão repetidamente nos capítulos seguintes.

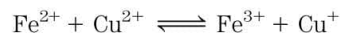
O fluxo de elétrons pode realizar trabalho biológico

Sempre que se usa um motor elétrico, uma lâmpada ou um aquecedor elétrico, ou, ainda, quando uma faísca promove a combustão da gasolina em um motor de automóveis, usa-se o fluxo de elétrons para realizar trabalho. No circuito que fornece energia a um motor, a fonte de elétrons pode ser uma bateria contendo duas espécies químicas com afinidades diferentes por elétrons. Os fios elétricos proporcionam um caminho para o fluxo dos elétrons entre as espécies químicas localizadas em um polo da bateria, por meio do motor, até as espécies químicas localizadas no outro polo da bateria. Como as duas espécies químicas diferem em suas afinidades por elétrons, eles fluem espontaneamente ao longo do circuito, impulsionados por uma força proporcional à diferença de afinidade por elétrons, a **força eletromotriz (fem)**. A fem (geralmente alguns volts) é capaz de realizar trabalho caso um transdutor de energia apropriado, nesse caso um motor, seja incluído no circuito. O motor pode ser acoplado a uma grande variedade de equipamentos mecânicos para realizar trabalho útil.

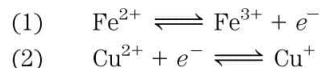
As células vivas têm um “circuito” biológico análogo, com compostos relativamente reduzidos, como, por exemplo, a glicose, como fonte de elétrons. À medida que a glicose é oxidada enzimaticamente, os elétrons liberados fluem de modo espontâneo por uma série de intermediários transportadores de elétrons para outras espécies químicas, como o O_2 . Esse fluxo de elétrons é exergônico, já que o O_2 tem maior afinidade por elétrons do que os intermediários transportadores de elétrons. A fem resultante fornece energia para uma grande variedade de transdutores moleculares de energia (enzimas e outras proteínas) que realizam trabalho biológico. Na mitocôndria, por exemplo, enzimas ligadas à membrana acoplam o fluxo de elétrons à produção de uma diferença de pH transmembrana, além de um potencial elétrico transmembrana, realizando trabalho osmótico e elétrico. O gradiente de prótons assim formado tem energia potencial, algumas vezes chamada de força próton-motriz, em analogia à força eletromotriz. Outra enzima, a ATP-sintase, localizada na membrana interna da mitocôndria, usa a força próton-motriz para realizar trabalho químico: a síntese de ATP a partir de ADP e P_i à medida que os prótons fluem espontaneamente através da membrana. De modo semelhante, em *E. coli* as enzimas localizadas na membrana convertem fem em força próton-motriz, que é posteriormente utilizada para impulsionar o movimento flagelar. Os princípios da eletroquímica que governam as variações de energia nos circuitos macroscópicos, como um motor elétrico e uma bateria, aplicam-se com a mesma validade para processos moleculares associados ao fluxo de elétrons em células vivas.

As reações de oxidação-redução podem ser descritas como semirreações

Embora a oxidação e a redução ocorram em conjunto, para descrever a transferência de elétrons é conveniente considerar as duas metades de uma reação de oxidação-redução separadamente. Por exemplo, a oxidação do íon ferro pelo íon cobre,

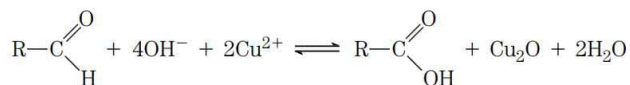


pode ser descrita nos termos de duas semirreações:

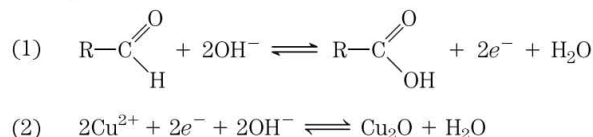


A molécula doadora de elétrons em uma reação de oxidação-redução é chamada de agente redutor, ou simplesmente redutor; a molécula receptora de elétrons é o agente oxidante, ou simplesmente oxidante. Determinado agente, como um íon ferro, que existe no estado ferroso (Fe^{2+}) ou férrico (Fe^{3+}), atua como par conjugado oxidante-redutor (par *redox*), assim como um ácido e a base correspondente atuam como par conjugado ácido-base. Lembre-se, do Capítulo 2, de que uma reação acidobásica pode ser escrita como uma equação geral: doador de próton $\rightleftharpoons H^+$ +ceptor de próton. Uma equação geral similar pode ser escrita para as reações *redox*: doador de elétron (redutor) $\rightleftharpoons e^-$ +ceptor de elétron (oxidante). Na semirreação reversível acima (1), Fe^{2+} é o doador de elétrons e Fe^{3+} é oceptor de elétrons: juntos, Fe^{2+} e Fe^{3+} constituem um **par conjugado redox**. O termo mnemônico OIL RIG (do inglês, *oxidation is losing, reduction is gaining*) pode ajudar a lembrar o que acontece nas reações redox.

As transferências de elétrons nas reações de oxidação-redução de compostos orgânicos não são fundamentalmente diferentes daquelas das espécies inorgânicas. Considere a oxidação de um açúcar redutor (um aldeído ou uma cetona) pelo íon cobre:



Esta equação global pode ser expressa como duas semirreações:



Observe que, como são removidos dois elétrons do carbono do aldeído, a segunda metade da reação (a redução por um elétron do íon cúprico a cuproso) deve ser multiplicada por dois para equilibrar a equação global.

As oxidações biológicas geralmente envolvem desidrogenação

Nas células vivas, o carbono encontra-se em diferentes estados de oxidação (**Figura 13-22**). Quando um átomo de

carbono compartilha um par de elétrons com outro átomo (normalmente H, C, S, N ou O), o compartilhamento é desigual, em favor do átomo mais eletronegativo. A ordem crescente de eletronegatividade é $H < C < S < N < O$. De forma muito simplificada, porém útil, o átomo mais eletronegativo é o que “possui” os elétrons da ligação que ele compartilha com o outro átomo. Por exemplo, no metano (CH_4), o carbono é mais eletronegativo que os quatro hidrogênios ligados a ele; portanto, o átomo de carbono “possui” os oito elétrons da ligação (Figura 13-22). No etano, os elétrons da ligação C—C são igualmente compartilhados; portanto, cada átomo de carbono “possui” apenas sete dos seus oito elétrons de ligação. No etanol, C-1 é menos eletronegativo que o oxigênio ao qual ele está ligado, e, assim, o átomo de O “possui” os dois elétrons da ligação C—O, deixando C-1 com apenas cinco elétrons de ligação. O átomo de carbono sofre oxidação com qualquer perda formal de elétrons que “possua”, mesmo sem a participação de oxigênio, como na conversão do alceno ($-CH_2-CH_2-$) para o alcino ($-CH=CH-$). Nesse caso, a oxidação (perda de elétrons) coincide com a perda de hidrogênio. Em sistemas biológicos, como mencionado neste capítulo, a oxidação muitas vezes é sinônimo de **desidrogenação**, e muitas enzimas que catalisam reações de oxidação são **desidrogenases**. Observe que os compostos mais reduzidos na Figura 13-22 (superior) são mais ricos em hidrogênio do que em oxigênio, ao passo que os compostos mais oxidados (inferior) contêm mais oxigênios e menos hidrogênios.

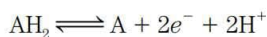
Nem todas as reações de oxidação-redução envolvem carbono. Por exemplo, na conversão do nitrogênio molecular para amônia, $6H^+ + 6e^- + N_2 \rightarrow 2NH_3$, os átomos de nitrogênio são reduzidos.

Os elétrons são transferidos de uma molécula (doadora de elétrons) para outra (aceptora de elétrons) por meio de uma das quatro vias:

1. Diretamente *como elétrons*. Por exemplo, o par *redox* Fe^{2+}/Fe^{3+} pode transferir um elétron para o par *redox* Cu^+/Cu^{2+} :



2. Como *átomos de hidrogênio*. Lembre-se de que o átomo de hidrogênio consiste em um próton (H^+) e um único elétron (e^-). Neste caso, a equação geral é



em que AH_2 é o doador de hidrogênio/elétron. (Não confundir a reação acima com a dissociação de um ácido que envolve um próton e nenhum elétron.) AH_2 e A, juntos, constituem um par conjugado *redox* (A/AH_2), o qual é capaz de reduzir outro composto B (ou par *redox*, B/BH_2) por transferência de átomos de hidrogênio:



3. Na forma de *íon hidreto* ($:H^-$), que tem dois elétrons. Isso ocorre no caso de desidrogenases ligadas à NAD, descritas posteriormente.

Metano		8
Etano (alceno)		7
Eteno (alceno)		6
Etanol (álcool)		5
Acetileno (alcino)		5
Formaldeído		4
Acetaldeído (aldeído)		3
Acetona (cetona)		2
Ácido fórmico (ácido carboxílico)		2
Monóxido de carbono		2
Ácido acético (ácido carboxílico)		1
Dióxido de carbono		0

FIGURA 13-22 Diferentes níveis de oxidação dos compostos de carbono na biosfera.

Para verificar o nível de oxidação desses compostos basta concentrar-se no átomo de carbono em vermelho e em seus elétrons de ligação. Quando este carbono estiver ligado a um átomo de H, menos eletronegativo, os dois elétrons da ligação (em vermelho) serão cedidos ao carbono. Quando o carbono estiver ligado a outro carbono, os elétrons da ligação serão igualmente compartilhados, de modo que um dos dois elétrons é cedido ao carbono em vermelho. Quando o carbono em vermelho estiver ligado a um átomo de O, mais eletronegativo, os elétrons da ligação são cedidos ao oxigênio. O número à direita de cada composto é o número de elétrons “pertencentes” ao carbono em vermelho, uma indicação aproximada do grau de oxidação de cada composto. À medida que o carbono em vermelho sofre oxidação (perde elétrons), o número torna-se menor.

4. Pela *combinação direta com oxigênio*. Neste caso, o oxigênio combina-se com um redutor orgânico e é covalentemente incorporado no produto, como na oxidação de um hidrocarboneto em um álcool:

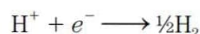


O hidrocarboneto é o doador de elétrons e o átomo de oxigênio é o receptor de elétrons.

Todos os quatro tipos de transferência de elétrons ocorrem nas células. O termo **equivalente redutor** é comumente usado para designar um único equivalente eletrônico que participa de uma reação de oxidação-redução, não importando se este é um elétron em si, parte de um átomo de hidrogênio ou mesmo um íon hidreto, ou ainda se a transferência do elétron ocorre em uma reação com oxigênio, gerando um produto oxigenado.

Os potenciais de redução medem a afinidade por elétrons

Quando dois pares conjugados *redox* estão juntos em solução, a transferência de elétrons do par doador para o par receptor pode ocorrer espontaneamente. A tendência para que a reação ocorra depende da afinidade relativa do receptor de elétrons de cada par *redox* pelos elétrons. O **potencial de redução padrão, E°** , a medida (em volts) dessa afinidade, pode ser determinado em um experimento como o descrito na Figura 13-23. Os eletroquímicos escolheram como um padrão de referência a semirreação



O eletrodo em que essa semirreação ocorre (chamado de semicélula) é atribuído arbitrariamente um potencial de redução padrão E° de 0,00 V. Quando esse eletrodo de hidrogênio está conectado por meio de um circuito externo a outra semicélula em que as espécies oxidadas e as suas correspondentes espécies reduzidas estão presentes em concentrações-padrão (25°C, cada soluto a 1 M, e cada gás a 101,3 kPa), os elétrons tendem a fluir pelo circuito externo, indo da semicélula de menor valor de E° para a semicélula de maior valor de E° . Por convenção, a uma semicélula que retira elétrons de uma célula padrão de hidrogênio é designado um valor positivo de E° , e àquela que doa elétrons para a célula de hidrogênio, um valor negativo. Quando qualquer metade de duas semicélulas estiver conectada, aquela com maior E° (mais positiva) será reduzida, pois ela tem um potencial de redução maior.

O potencial de redução de uma semicélula não depende apenas das espécies químicas presentes, mas também de suas atividades, estimadas por suas concentrações. Há aproximadamente um século, Walther Nernst derivou uma equação que relaciona o potencial de redução padrão (E°) ao potencial de redução real (E) em qualquer concentração das espécies oxidadas e reduzidas em uma célula viva:

$$E = E^\circ + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{receptor de elétron}]}{[\text{doador de elétron}]} \quad (13-5)$$

em que R e T possuem dois significados comuns, n é o número de elétrons transferidos por molécula e F é a constante de Faraday, uma constante de proporcionalidade que

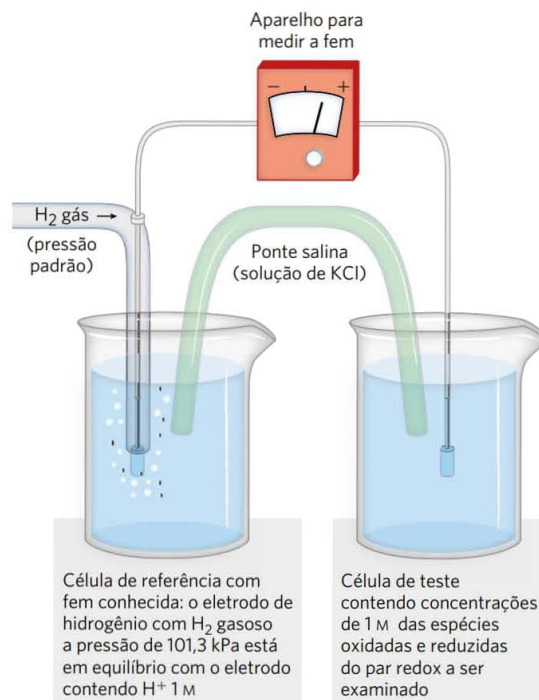


FIGURA 13-23 Determinação do potencial de redução padrão (E°) de um par *redox*. Os elétrons fluem do eletrodo de teste para o eletrodo de referência, ou vice-versa.

A semicélula de referência é o eletrodo de hidrogênio, como representado aqui, a pH zero. A força eletromotriz (fem) deste eletrodo é designada 0,00 V. Em pH 7,0 (25°C) na célula de teste, o E° do eletrodo de hidrogênio é -0,414 V. O sentido do fluxo dos elétrons depende da "pressão" relativa dos elétrons ou do potencial das duas células. Uma ponte salina contendo uma solução de KCl saturada fornece um caminho para o movimento dos íons entre a célula de teste e a célula de referência. A partir da fem observada e a fem conhecida da célula de referência, o aparelho é capaz de medir a fem da célula de teste contendo o par *redox*. A célula que recebe os elétrons tem, por convenção, o potencial de redução mais positivo.

converte volts em joules (Tabela 13-1). A 298 K (25°C), essa expressão se reduz a

$$E = E^\circ + \frac{0,026 \text{ V}}{n} \ln \frac{[\text{receptor de elétron}]}{[\text{doador de elétron}]} \quad (13-6)$$

>> Convenção-chave: Muitas semirreações de interesse dos bioquímicos envolvem prótons. Do mesmo modo que na definição de ΔG° , os bioquímicos definem o estado-padrão de oxidação-redução em pH 7,0, o que é expresso como potencial-padrão de oxidação-redução transformado, E'° , o potencial de redução padrão em pH 7 e 25°C. Por convenção, $\Delta E'^\circ$ de qualquer reação *redox* é dado como E'° do receptor de elétrons menos E'° do doador de elétrons. <<

Os potenciais de redução padrão apresentados na Tabela 13-7 e utilizados ao longo deste livro são valores de E'° , sendo, assim, válidos apenas para sistemas em pH neutro. Cada valor representa a diferença de potencial quando o par *redox* conjugado, na concentração de 1 M, 25°C e pH 7, é conectado ao eletrodo-padrão de hidrogênio (pH 0). Obser-

TABELA 13-7 Potenciais de redução padrão de algumas semirreações de importância biológica

Semirreação	E'° (V)
$\frac{1}{2}\text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{H}_2\text{O}$	0,816
$\text{Fe}^{3+} + e^- \longrightarrow \text{Fe}^{2+}$	0,771
$\text{NO}_3^- + 2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$	0,421
Citocromo <i>f</i> (Fe^{3+}) + $e^- \longrightarrow$ citocromo <i>f</i> (Fe^{2+})	0,365
$\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ (ferricianeto) + $e^- \longrightarrow \text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$	0,36
Citocromo <i>a</i> ₃ (Fe^{3+}) + $e^- \longrightarrow$ citocromo <i>a</i> ₃ (Fe^{2+})	0,35
$\text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2$	0,295
Citocromo <i>a</i> (Fe^{3+}) + $e^- \longrightarrow$ citocromo <i>a</i> (Fe^{2+})	0,29
Citocromo <i>c</i> (Fe^{3+}) + $e^- \longrightarrow$ citocromo <i>c</i> (Fe^{2+})	0,254
Citocromo <i>c</i> ₁ (Fe^{3+}) + $e^- \longrightarrow$ citocromo <i>c</i> ₁ (Fe^{2+})	0,22
Citocromo <i>b</i> (Fe^{3+}) + $e^- \longrightarrow$ citocromo <i>b</i> (Fe^{2+})	0,077
Ubiquinona + $2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow$ ubiquinol	0,045
Fumarato ²⁻ + $2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow$ succinato ²⁻	0,031
$2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{H}_2$ (em condições-padrão, pH 0)	0,000
Crotonil-CoA + $2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow$ butiril-CoA	-0,015
Oxalacetato ²⁻ + $2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow$ malato ²⁻	-0,166
Piruvato ⁻ + $2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow$ lactato ⁻	-0,185
Acetaldeído + $2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow$ etanol	-0,197
$\text{FAD} + 2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{FADH}_2$	-0,219 ^a
Glutationa + $2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow$ 2 glutationa reduzida	-0,23
$\text{S} + 2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{H}_2\text{S}$	-0,243
Ácido lipoico + $2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow$ ácido di-hidrolipoico	-0,29
$\text{NAD}^+ + \text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{NADH}$	-0,320
$\text{NADP}^+ + \text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{NADPH}$	-0,324
Acetoacetato + $2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \beta$ -hidroxibutirato	-0,346
α -cetoglutarato + $\text{CO}_2 + 2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow$ isocitrato	-0,38
$2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{H}_2$ (em pH 7)	-0,414
Ferridoxina (Fe^{3+}) + $e^- \longrightarrow$ ferridoxina (Fe^{2+})	-0,432

Fonte: os dados são principalmente de R. A. Loach, de *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, 3^a ed. (G. D. Fasman, ed.), *Physical and Chemical Data*, Vol. 1, p. 122, CRC Press, 1976.

^aEsse é o valor de FAD livre; FAD ligado a flavoproteínas específicas (p. ex., succinato-desidrogenase) tem E'° diferentes que dependem do ambiente na proteína.

ve, na Tabela 13-7, que, quando o par conjugado $2\text{H}^+/\text{H}_2$ em pH 7 está conectado com o eletrodo-padrão de hidrogênio (pH 0), os elétrons tendem a fluir, partindo da célula com pH 7 para a célula-padrão (pH 0); o valor de E'° para o par $2\text{H}^+/\text{H}_2$ é -0,414 V.

Os potenciais de redução padrão podem ser usados para calcular a variação de energia livre

Por que os potenciais de redução são tão úteis para os bioquímicos? Quando os valores de E são determinados para duas semicélulas quaisquer, em relação ao eletrodo-padrão de hidrogênio, também são conhecidos os potenciais de redução de uma semicélula em relação à outra. Assim, é possível prever o sentido em que os elétrons tenderão a fluir quando as duas semicélulas estão conectadas por um circuito externo ou quando os componentes das duas semicélulas estão presentes na mesma solução. Os elétrons tendem a fluir das semicélulas com E , mais positivos, e a força dessa tendência é proporcional a ΔE , a diferença no potencial de redução. A energia disponibilizada por esse fluxo espontâneo de elétrons (a variação na energia livre, ΔG , para a reação de oxidação-redução) é proporcional a ΔE :

$$\Delta G = -nF\Delta E \quad \text{ou} \quad \Delta G'^{\circ} = -nF\Delta E'^{\circ} \quad (13-7)$$

em que n é o número de elétrons transferidos na reação. Essa equação permite calcular a variação de energia livre real para qualquer reação de oxidação-redução a partir dos valores de $\Delta E'^{\circ}$ apresentados em uma tabela de potenciais de redução (Tabela 13-7) e das concentrações das espécies envolvidas na reação.

PROBLEMA 13-3 Cálculo de $\Delta G'^{\circ}$ e ΔG de uma reação redox

Calcule a variação de energia livre padrão, $\Delta G'^{\circ}$, para a reação na qual acetaldeído é reduzido pelo carreador de elétrons biológico NADH:



Depois, calcule a variação de energia livre *real*, ΔG , quando [acetaldeído] e NADH forem 1,00 M e quando [etanol] e [NAD⁺] forem 0,100 M. As semirreações relevantes e os respectivos valores de E'° são:

- (1) $\text{Acetaldeído} + 2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{etanol}$
 $E'^{\circ} = -0,197 \text{ V}$
- (2) $\text{NAD}^+ + 2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{NADH} + \text{H}^+$
 $E'^{\circ} = -0,320 \text{ V}$

Lembre-se de que, por convenção, $\Delta E'^{\circ}$ é E'° do receptor de elétrons menos E'° do doador de elétrons. Ela representa a diferença entre as afinidades dos elétrons das duas semirreações na tabela dos potenciais de redução (Tabela 13-7). Observe que, quanto mais separadas as duas semirreações estiverem na tabela, mais energética será a reação de transferência de elétrons quando as duas semirreações ocorrem juntas. Foi convencionalizado que, nas tabelas de potenciais de redução, todas as semirreações são representadas como reduções, porém, quando duas semirreações ocorrem juntas, uma delas deve ser uma oxidação. Mesmo que uma semirreação ocorra na direção contrária à apresentada na Tabela 13-7, *não se troca o sinal* dessa semirreação antes de cal-

cular $\Delta E'^{\circ}$, uma vez que $\Delta E'^{\circ}$ é *definido* como a diferença entre os potenciais de redução.

Solução: como é o acetaldeído que recebe elétrons ($n = 2$) do NADH, $\Delta E'^{\circ} = -0,197 \text{ V} - (-0,320 \text{ V}) = 0,123 \text{ V}$. Portanto,

$$\Delta G'^{\circ} = -nF\Delta E'^{\circ} = -2(96,5 \text{ kJ/V} \cdot \text{mol})(0,123 \text{ V}) = -23,7 \text{ kJ/mol}$$

Essa é a variação de energia livre para a reação de oxidação-redução a 25°C e pH 7, quando acetaldeído, etanol, NAD^+ e NADH estiverem todos presentes em concentrações de 1,00 M.

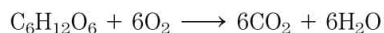
Para calcular ΔG quando [acetaldeído] e [NADH] forem 1,00 M e [etanol] e $[\text{NAD}^+]$ forem 0,100 M, pode-se usar a Equação 13-4 e a variação de energia livre padrão calculada acima:

$$\begin{aligned}\Delta G &= \Delta G'^{\circ} + RT \ln \frac{[\text{etanol}][\text{NAD}^+]}{[\text{acetaldeído}][\text{NADH}]} \\ &= -23,7 \text{ kJ/mol} + \\ &\quad (8,315 \text{ J/mol} \cdot \text{K})(298 \text{ K}) \ln \frac{(0,100 \text{ M})(0,100 \text{ M})}{(1,00 \text{ M})(1,00 \text{ M})} \\ &= -23,7 \text{ kJ/mol} + (2,48 \text{ J/mol}) \ln 0,01 \\ &= -35,1 \text{ kJ/mol}\end{aligned}$$

Esta é a variação de energia livre real dos pares *redox* nas concentrações especificadas.

A oxidação celular da glicose em dióxido de carbono requer transportadores de elétrons especializados

Os princípios da energética da oxidação-redução descritos anteriormente aplicam-se às muitas reações metabólicas que envolvem a transferência de elétrons. Por exemplo, em muitos organismos, a oxidação da glicose fornece energia para a síntese de ATP. A oxidação completa da glicose:



tem $\Delta G'^{\circ}$ de -2.840 kJ/mol . Esse valor indica uma liberação de energia livre muito maior do que a necessária para a síntese de ATP nas células (50 a 60 kJ/mol; ver Problema 13-2). As células não convertem glicose em CO_2 em uma única reação com elevada liberação de energia, mas sim por meio de uma série de reações controladas, sendo que algumas delas são oxidações. A energia livre liberada nessas etapas de oxidação é da mesma ordem de magnitude que a necessária para a síntese de ATP a partir de ADP, com alguma energia extra. Os elétrons removidos nessas etapas de oxidação são transferidos para coenzimas especializadas em transportar elétrons, como NAD^+ e FAD (descritos a seguir).

Alguns tipos de coenzimas e proteínas servem como transportadores universais de elétrons

O grande número de enzimas que catalisam as oxidações celulares direciona os elétrons das suas centenas de

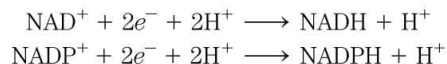
substratos diferentes para apenas alguns poucos tipos de transportadores de elétrons universais. A redução desses transportadores em processos catabólicos resulta na conversão de energia livre liberada pela oxidação do substrato. NAD, NADP, FMN e FAD são coenzimas solúveis em água que sofrem oxidações e reduções reversíveis em muitas das reações de transferência de elétrons do metabolismo. Os nucleotídeos NAD e NADP movem-se facilmente de uma enzima para outra; os nucleotídeos de flavina FMN e FAD em geral estão fortemente ligados às enzimas, chamadas de flavoproteínas, para as quais eles servem de grupos prostéticos. As quinonas lipossolúveis, como a ubiquinona e a plastoquinona, atuam como transportadores de elétrons e doadores de prótons no meio não aquoso das membranas. As proteínas ferro-enxofre e citocromos, as quais têm grupos prostéticos fortemente ligados e que sofrem oxidação e redução reversíveis, também atuam como transportadores de elétrons em muitas reações de oxidação-redução. Algumas dessas proteínas são hidrossolúveis, ao passo que outras são periféricas ou integrais de membrana (ver Figura 11-6).

Conclui-se este capítulo descrevendo algumas características químicas das coenzimas nucleotídicas e de algumas das enzimas (desidrogenases e flavoproteínas) que as utilizam. A química da oxidação-redução das quinonas, proteínas ferro-enxofre e citocromos será discutida nos Capítulos 19 e 20.

NADH e NADPH atuam com as desidrogenases como transportadores solúveis de elétrons

O nicotinamida-adenina dinucleotídeo (NAD, do inglês, *nicotinamide adenine dinucleotide*; NAD^+ na sua forma oxidada) e seu análogo nicotinamida-adenina dinucleotídeo-fosfato (NADP, do inglês, *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*; NADP^+ quando oxidado) são constituídos de dois nucleotídeos, cujos grupos fosfato são unidos por uma ligação fosfoanidrido (**Figura 13-24a**). Como o anel de nicotinamida lembra a piridina, algumas vezes esses compostos são chamados de **nucleotídeos de piridina**. A vitamina niacina é a fonte da porção nicotinamida dessas moléculas.

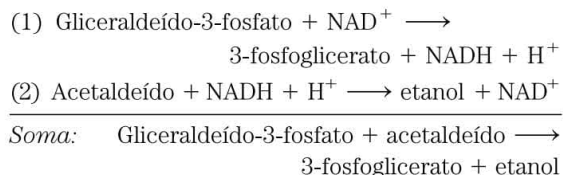
As duas coenzimas sofrem redução reversível do anel de nicotinamida (**Figura 13-24**). Enquanto uma molécula do substrato sofre oxidação (desidrogenação), liberando dois átomos de hidrogênio, a forma oxidada do nucleotídeo (NAD^+ ou NADP^+) recebe um íon hidreto (:H^- , o equivalente a um próton e dois elétrons) e é reduzida (a NADH ou NADPH). O segundo próton retirado do substrato é liberado para o solvente aquoso. As semirreações para esses cofatores nucleotídicos são



A redução de NAD^+ ou NADP^+ converte o anel benzenoide da porção nicotinamida (com uma carga positiva fixa no nitrogênio do anel) na forma quinoide (nitrogênio sem carga). Os nucleotídeos reduzidos absorvem luz em 340 nm, e as formas oxidadas, não (**Figura 13-24b**). Os bioquí-

vado, chamado de estrutura de Rossmann (de Michael Rossmann, que deduziu a estrutura da lactato-desidrogenase e foi o primeiro a descrever esse motivo estrutural). O enovelamento de Rossmann consiste geralmente de seis folhas β antiparalelas associadas com quatro α -hélices (Figura 13-25).

A associação entre a desidrogenase e NAD ou NADP é relativamente fraca; a coenzima difunde-se facilmente de uma enzima para a outra, atuando como transportador hidrossolúvel de elétrons de um metabólito para outro. Por exemplo, na produção de álcool durante a fermentação de glicose por células de levedura, há remoção de um íon hidreto do gliceraldeído-3-fosfato por uma enzima (a gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase) e transferência para o NAD^+ . O NADH produzido, então, deixa a superfície da enzima e se difunde para outra enzima (a álcool-desidrogenase), que transfere o íon hidreto para o acetaldeído, produzindo etanol:



Observe que, na reação geral, não há produção líquida ou consumo de NAD^+ ou NADH. A coenzima funciona cataliticamente e é reciclada continuamente sem haver mudança na concentração total de $\text{NAD}^+ + \text{NADH}$.

Tanto a forma reduzida como a forma oxidada de NAD e NADP agem como efetores alostéricos de proteínas de vias catabólicas. Como será descrito nos próximos capítulos, as relações NAD^+/NADH e $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ servem de indicadores sensíveis do suprimento de combustível das células, permitindo haver mudanças rápidas e apropriadas no metabolismo que depende de energia e que produz energia.

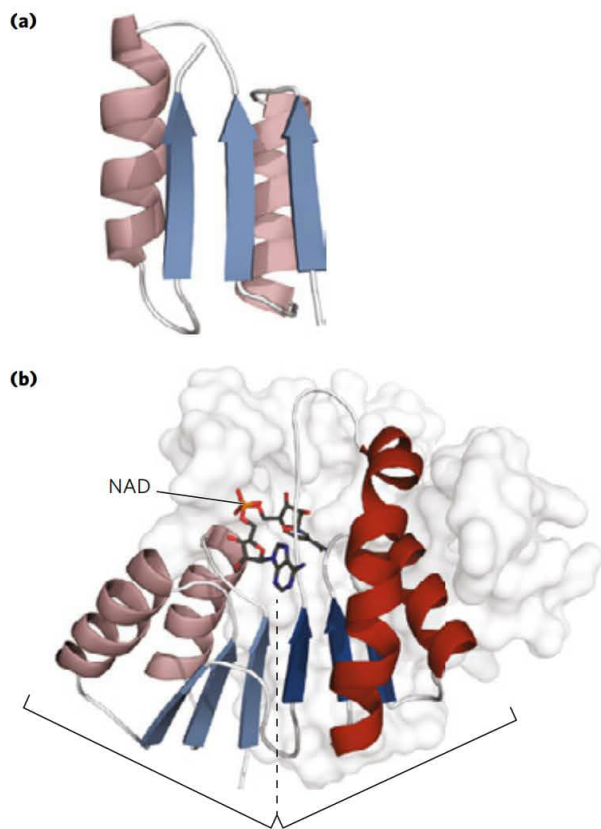


FIGURA 13-25 A estrutura de Rossmann. Este motivo estrutural é encontrado no sítio de ligação a NAD de muitas desidrogenases. **(a)** Ele é formado por um par de motivos estruturalmente semelhantes (apenas um está mostrado). Cada um tem três folhas β antiparalelas e duas α -hélices (β - α - β - α - β). **(b)** O domínio de ligação ao nucleotídeo da enzima lactato-desidrogenase com NAD (estrutura esteira-e-bastão) ligado em uma conformação estendida por meio de ligações de hidrogênio e pontes salinas ao par de motivos de Rossmann β - α - β - α - β (sombreados em vermelho e azul). [Fonte: derivada de PDB ID 3LDH, J. L. White et al., *J. Mol. Biol.* 102:759, 1976.]

NAD tem funções importantes além de transferir elétrons

Algumas funções celulares importantes são reguladas por enzimas que utilizam NAD^+ não como um cofator *redox*, mas como substrato em reações acopladas, nas quais a disponibilidade de NAD^+ pode ser um indicador do estado energético da célula. Na replicação e reparo do DNA, a enzima DNA-ligase é adenilada e, então, transfere o AMP para o fosfato 5' no DNA rompido (ver Figura 25-16). Em bactérias, o NAD^+ serve de fonte para o grupo ativador AMP. A família de proteínas sirtuína regula a atividade de proteínas em diversas vias celulares por desacetilar o grupo ϵ -amino de resíduos de Lys acetilados. A desacetilação é acoplada à hidrólise de NAD^+ , produzindo *O*-acetil-ADP-ribose e nicotinamida. Entre os processos celulares regulados por sirtuínas estão inflamação, apoptose, envelhecimento e transcrição de DNA. A desacetilação por sirtuína altera a carga das histonas, influenciando, assim, quais genes serão expressos (ver p. 1149). A disponibilidade de NAD^+ para reações desse tipo pode indicar que a célula está sob estresse e que vias envolvidas em responder ao estresse devem ser ativadas.



NAD^+ também desempenha um papel importante na infecção por cólera (ver Quadro 12-1). A toxina do cólera tem uma atividade enzimática que transfere ADP-ribose de NAD^+ para uma proteína G envolvida na regulação do fluxo de íons nas células que revestem o tubo digestório. Essa ADP-ribosilação bloqueia a retenção de água, causando diarreia e desidratação, características da cólera. ■

A deficiência de niacina na dieta, a forma vitamínica de NAD e NADP, causa pelagra



Como observado no Capítulo 6 e será ainda discutido nos próximos capítulos, muitas coenzimas são derivadas de substâncias denominadas vitaminas. Os anéis semelhantes à piridina de NAD e NADP são derivados da

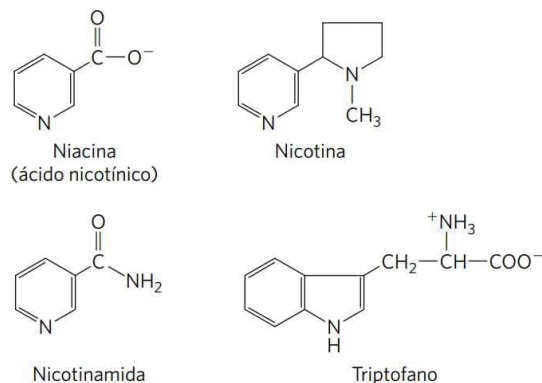


FIGURA 13-26 Niacina (ácido nicotínico) e seu derivado nicotinamida. O precursor biossintético desses compostos é o triptofano. Em laboratório, o ácido nicotínico foi produzido, pela primeira vez, por oxidação do produto natural, a nicotina – daí seu nome. Tanto o ácido nicotínico quanto a nicotinamida são capazes de curar a pelagra, mas a nicotina (do cigarro ou de outras fontes) não tem atividade curativa.



Frank Strong, 1908-1993
[Fonte: cortesia do Department of Biochemistry, University of Wisconsin-Madison.]



D. Wayne Woolley, 1914-1966
[Fonte: Rockefeller Archive Center.]

vitamina **niacina** (ácido nicotínico; **Figura 13-26**), sintetizada a partir do triptofano. Os seres humanos geralmente são incapazes de sintetizar quantidades suficientes de niacina, sobretudo as pessoas com dieta pobre em triptofano (p. ex., o milho tem baixo conteúdo de triptofano). A deficiência de niacina, que afeta todas as desidrogenases dependentes de NAD(P), causa uma patologia humana grave, chamada de pelagra (“pele áspera”, em italiano) e uma doença relacionada, em caninos, chamada de língua negra. A pelagra é uma doença caracterizada por “três Ds”: dermatite, diarreia e demência, seguidos, em muitos casos, por morte. Há um século, a pelagra era uma doença comum na humanidade; no sul dos Estados Unidos, onde o milho era a base da dieta, aproximadamente 100 mil pessoas foram afetadas e em torno de 10 mil morreram em razão dessa doença, entre 1912 e 1916. Em 1920, Joseph Goldberger demonstrou que a pelagra é causada por uma deficiência na dieta, e, em 1937, Frank Strong, D. Wayne Woolley e Conrad Elvehjem identificaram a niaci-



Conrad Elvehjem, 1901-1962
[Fonte: cortesia do Department of Biochemistry, University of Wisconsin-Madison.]

na como o agente curativo para a língua negra. A suplementação da dieta humana com este composto barato fez a pelagra ser praticamente erradicada nas populações do mundo desenvolvido, com uma exceção significativa: as pessoas que consomem álcool em excesso. Nesses indivíduos, a absorção intestinal de niacina é muito reduzida, e as necessidades calóricas com frequência são supridas pelo álcool contido nas bebidas destiladas, praticamente destituídas de vitaminas, inclusive niacina. ■

Os nucleotídeos de flavina são fortemente ligados às flavoproteínas

As **flavoproteínas** (Tabela 13-9) são enzimas que catalisam reações de oxidação-redução utilizando como coenzima tanto a flavina mononucleotídeo (FMN, do inglês, *flavin mononucleotides*) quanto a flavina-adenina dinucleotídeo (FAD, do inglês, *flavin adenine dinucleotides*) (**Figura 13-27**). Essas coenzimas, os **nucleotídeos de flavina**, são derivadas da vitamina riboflavina. A estrutura de anéis fusionados dos nucleotídeos de flavina (anel de isoaloxazina) sofre redução reversível, recebendo um ou dois elétrons na forma de um ou dois átomos de hidrogênio (cada átomo: um elétron mais um próton) de um substrato reduzido. As formas totalmente reduzidas são abreviadas FADH₂ e FMNH₂. Quando um nucleotídeo de flavina totalmente oxidado recebe apenas um elétron (um átomo de hidrogênio), é produzida a forma semiquinona do anel de isoaloxazina, abreviado como FADH• e FMNH•. Como os nucleotídeos de flavina possuem características químicas ligeiramente diferentes daquelas das coenzimas nicotinamidas – a capacidade de participar na transferência de um ou dois elétrons – as flavoproteínas estão envolvidas em uma diversidade maior de reações do que as desidrogenases ligadas a NAD(P).

Assim como as coenzimas nicotinamidas (Figura 13-24), a redução dos nucleotídeos de flavina é acompanhada por uma mudança da sua principal banda de absorção de luz (mais uma vez útil aos bioquímicos que desejam monitorar reações envolvendo essas coenzimas). As flavoproteínas completamente reduzidas (que receberam dois elétrons) geralmente tem um pico máximo de absorção próximo a 360 nm. Quando parcialmente reduzidas (um elétron), elas apresentam um outro pico máximo de absorção em cerca de 450 nm; quando totalmente oxidadas, a flavina tem picos máximos em 370 nm e 440 nm.

Na maioria das flavoproteínas, o nucleotídeo de flavina encontra-se fortemente ligado à proteína, e, em algumas enzimas, como na succinato-desidrogenase, ele está ligado covalentemente. Essas coenzimas fortemente ligadas são apropriadamente chamadas de grupos prostéticos. Elas não transferem elétrons por difusão de uma enzima para a ou-

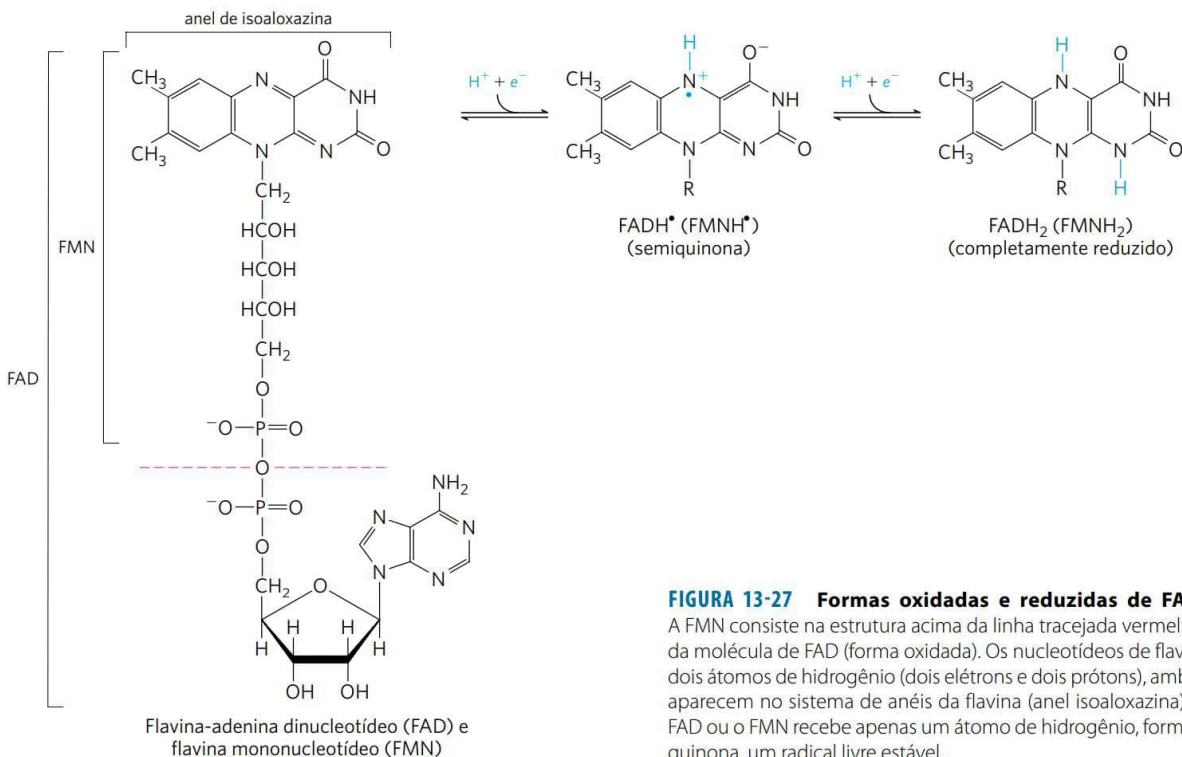


FIGURA 13-27 Formas oxidadas e reduzidas de FAD e FMN.

A FMN consiste na estrutura acima da linha tracejada vermelha ao longo da molécula de FAD (forma oxidada). Os nucleotídeos de flavina aceitam dois átomos de hidrogênio (dois elétrons e dois prótons), ambos dos quais aparecem no sistema de anéis da flavina (anel isoaloxazina). Quando o FAD ou o FMN recebe apenas um átomo de hidrogênio, forma-se a semiquinona, um radical livre estável.

tra; em vez disso, elas fornecem um meio pelo qual as flavoproteínas podem reter os elétrons temporariamente enquanto catalisam a transferência do elétron de um substrato reduzido para um aceptor de elétrons. Uma característica importante das flavoproteínas é a variabilidade do potencial de redução padrão (E'°) do nucleotídeo de flavina ligado. A forte associação entre a enzima e o grupo prostético confere ao anel de flavina um potencial de redução típico da flavoproteína em particular, algumas vezes bastante diferente do potencial de redução do nucleotídeo de flavina livre. O FAD ligado à succinato-desidrogenase, por exemplo, tem um valor de E'° próximo de 0,0 V, comparado com $-0,219$ V para o FAD livre; o valor de E'° para outras flavoproteínas varia de $-0,40$ V a $+0,06$ V. As flavoproteínas geralmente são muito complexas; algumas possuem, além de um nucleotídeo de flavina, íons inorgânicos fortemente ligados (p. ex., ferro ou molibdênio) capazes de participar da transferência de elétrons.

Certas flavoproteínas tem um papel muito diferente, como receptores de luz. Os **criptocromos**, família de flavoproteínas amplamente distribuídas nos filamentos eucarióticos, são responsáveis por mediar os efeitos da luz azul sobre o desenvolvimento das plantas e, nos mamíferos, os efeitos da luz sobre o ritmo circadiano (oscilações fisiológicas e bioquímicas em um período de 24 horas). Os criptocromos são homólogos de outra família de flavoproteínas, as fotoliasas. Encontradas em bactérias e em eucariotos, as **fotoliasas** utilizam a energia absorvida da luz para reparar defeitos químicos no DNA.

Nos Capítulos 19 e 20, serão estudadas as funções das flavoproteínas como transportadoras de elétrons, bem como suas funções na fosforilação oxidativa (em cloroplastos). As reações da fotoliase serão descritas no Capítulo 25.

RESUMO 13.4 Reações biológicas de oxidação-redução

- Em muitos organismos, o processo central de conservação de energia é a oxidação gradual da glicose em CO_2 , de forma que parte da energia de oxidação é conservada no ATP à medida que os elétrons passam para o O_2 .
- As reações biológicas de oxidação-redução podem ser descritas em termos de duas semirreações, cada uma com um potencial de redução padrão, E'° , característico.
- Quando duas semicélulas eletroquímicas estão conectadas, cada uma contendo os componentes de uma semirreação, os elétrons tendem a fluir para a semicélula com o maior potencial de redução. A força dessa tendência é proporcional à diferença entre os dois potenciais de redução (ΔE), sendo uma função das concentrações das espécies oxidadas e reduzidas.
- A variação de energia livre padrão para uma reação de oxidação-redução é diretamente proporcional à diferença dos potenciais de redução padrão das duas semicélulas: $\Delta G'^\circ = -nF \Delta E'^\circ$.
- Muitas oxidações biológicas são desidrogenações nas quais um ou dois átomos de hidrogênio ($\text{H}^+ + e^-$) são transferidos de um substrato para um aceptor de hidro-

gênio. As reações de oxidação-redução nas células envolvem transportadores especializados de elétrons.

- NAD e NADP são as coenzimas livremente difusíveis de muitas desidrogenases. Tanto NAD^+ como NADP^+ aceitam dois elétrons e um próton. O NAD^+ , além de seu papel em reações de oxidação-redução, é fonte de AMP nas DNA-ligasas bacterianas e reação da ADP-ribose na reação da toxina da cólera e é hidrolisado na desacetilação de proteínas por algumas sirtuínas.
- FAD e FMN, os nucleotídeos de flavina, atuam como grupos prostéticos fortemente ligados às flavoproteínas. Eles são capazes de aceitar um ou dois elétrons e um ou dois prótons. As flavoproteínas também servem como receptores de luz em criptocromos e fotoliasas.

Termos-chave

Termos em negrito estão definidos no glossário.

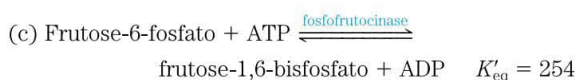
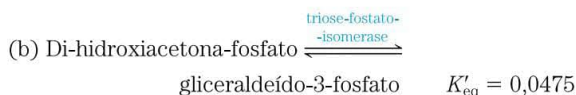
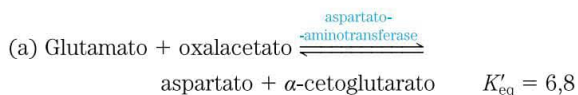
autotrófico 491	pirofosfatase inorgânica 513
heterotrófico 491	nucleosídeo-difosfato-cinase 516
metabolismo 492	adenilil-cinase 516
vias metabólicas 492	creatina-cinase 516
metabólito 492	fosfágenos 516
metabolismo intermediário 492	polifosfato-cinase 1, -cinase 2 517
catabolismo 492	força eletromotriz (fem) 518
anabolismo 492	par conjugado redox 518
constantes-padrão transformadas 497	desidrogenação 519
clivagem homolítica 502	desidrogenases 519
radical 502	equivalente redutor 520
clivagem heterolítica 502	potencial de redução padrão (E°) 520
nucleófilo 502	nucleotídeo de piridina 522
eletrófilo 502	oxidoredutase 523
carbânion 503	flavoproteína 525
carbocátion 503	nucleotídeos de flavina 525
condensação aldólica 503	criptocromo 526
condensação de Claisen 503	fotoliase 526
cinases 506	
potencial de fosforilação (ΔG_p) 507	
tioéster 510	
adenililação 513	

Teste seu conhecimento

1. Variação de entropia durante o desenvolvimento do ovo Considere um sistema constituído de um ovo em uma incubadora. A clara e a gema do ovo contêm proteínas, carboidratos e lipídeos. Se fertilizado, o ovo é transformado de uma única célula em um organismo complexo. Discuta esse processo irreversível em termos da variação de entropia do sistema, do meio e do universo. Não se esqueça de definir primeiro, claramente, o sistema e o meio.

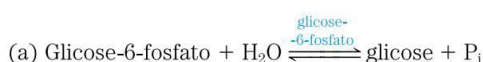
2. Cálculo de ΔG° a partir da constante de equilíbrio

Calcule a variação de energia livre padrão para cada uma das seguintes reações enzimáticas, metabolicamente importantes, utilizando as constantes de equilíbrio dadas para as reações a 25°C e pH 7,0.

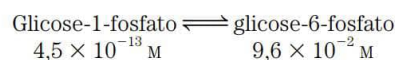


3. Cálculo da constante de equilíbrio ΔG°

Calcule a constante de equilíbrio K'_{eq} para cada uma das reações seguintes a pH 7,0 e 25°C usando os valores de ΔG° da Tabela 13-4.

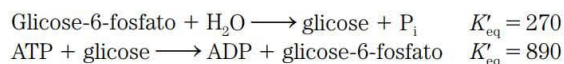


4. Determinação experimental de K'_{eq} e ΔG° Se uma solução de glicose-6-fosfato 0,1 M a 25°C for incubada com quantidades catalíticas de fosfoglicomutase, a glicose-1-fosfato é transformada em glicose-6-fosfato. No equilíbrio, as concentrações dos componentes da reação são



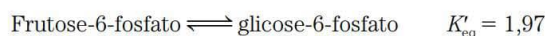
Calcule K'_{eq} e ΔG° dessa reação.

5. Determinação experimental de ΔG° para a hidrólise de ATP Uma medida direta da variação da energia livre padrão associada com a hidrólise de ATP é tecnicamente difícil, visto que é complicado medir com precisão a quantidade mínima de ATP remanescente no equilíbrio. O valor de ΔG° pode ser calculado indiretamente partindo das constantes de equilíbrio de duas outras reações enzimáticas que tenham constantes de equilíbrio menos favoráveis:



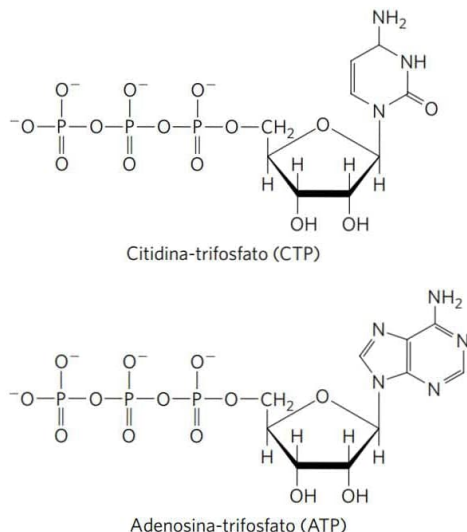
Usando essa informação para as constantes de equilíbrio determinadas a 25°C, calcule a energia livre padrão para a hidrólise de ATP.

6. Diferença entre ΔG° e ΔG Considere a seguinte interconversão que ocorre na glicólise (Capítulo 14):



- Qual é o valor de ΔG° da reação (K'_{eq} medido a 25°C)?
- Se a concentração de frutose-6-fosfato for ajustada em 0,50 M, qual será o valor de ΔG ?
- Por que ΔG° e ΔG são diferentes?

7. Energia livre de hidrólise do CTP Compare a estrutura do nucleosídeo-trifosfato CTP com a estrutura do ATP.

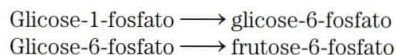


Prediga o K'_{eq} e a $\Delta G'^{\circ}$ da seguinte reação:



8. Dependência de ΔG ao pH A energia livre liberada pela hidrólise do ATP em condições-padrão é $-30,5 \text{ kJ/mol}$. Se ATP é hidrolisado em condições-padrão, porém em pH 5,0, a energia livre liberada é maior ou menor? Explique.

9. $\Delta G'^{\circ}$ de reações acopladas Glicose-1-fosfato é convertida em frutose-6-fosfato em duas reações sucessivas:



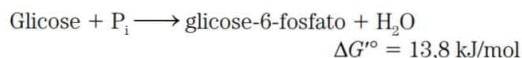
Usando os valores de $\Delta G'^{\circ}$ da Tabela 13-4, calcule a constante de equilíbrio, K'_{eq} , para a soma das duas reações:



10. Efeito da relação $[\text{ATP}]/[\text{ADP}]$ sobre a energia livre de hidrólise do ATP Usando a Equação 13-4, faça um gráfico de ΔG contra $\ln Q$ (relação da ação das massas) a 25°C para as concentrações de ATP, ADP e P_i apresentadas na tabela a seguir. O $\Delta G'^{\circ}$ para a reação é $-30,5 \text{ kJ/mol}$. Use o resultado do gráfico para explicar por que o metabolismo é regulado para manter alta a razão $[\text{ATP}]/[\text{ADP}]$.

	Concentração (mM)				
ATP	5	3	1	0,2	5
ADP	0,2	2,2	4,2	5,0	25
P_i	10	12,1	14,1	14,9	10

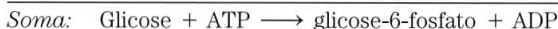
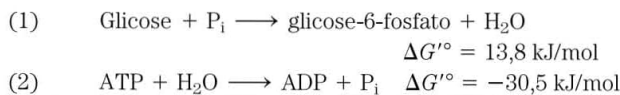
11. Estratégia para superar reações desfavoráveis: acoplamento químico dependente de ATP A fosforilação da glicose a glicose-6-fosfato é a etapa inicial no catabolismo da glicose. A fosforilação direta da glicose por P_i é descrita pela equação



(a) Calcule a constante de equilíbrio da reação a 37°C . Em hepatócitos de rato, as concentrações fisiológicas de glicose

e P_i são mantidas em aproximadamente $4,8 \text{ mM}$. Qual é a concentração de glicose-6-fosfato no equilíbrio quando obtida por fosforilação direta de glicose com P_i ? Esta reação representa um passo metabólico aceitável para o catabolismo da glicose? Explique.

- (b) Em princípio, pelo menos uma forma de aumentar a concentração de glicose-6-fosfato é direcionar o equilíbrio da reação para a direita, elevando as concentrações intracelulares de glicose e P_i . Supondo uma concentração fixa de P_i em $4,8 \text{ mM}$, quão elevada teria de ser a concentração de glicose intracelular para gerar uma concentração de equilíbrio de glicose-6-fosfato de $250 \mu\text{M}$ (a concentração fisiológica normal)? Esse caminho seria fisiologicamente aceitável, dado que a solubilidade máxima da glicose é menor que 1 mM ?
- (c) A fosforilação da glicose na célula está acoplada à hidrólise de ATP; isto é, parte da energia livre da hidrólise de ATP é usada para fosforilar a glicose:



Calcule a K'_{eq} a 37°C para a reação total. Para a fosforilação da glicose dependente de ATP, qual é a concentração de glicose necessária para atingir uma concentração intracelular de $250 \mu\text{M}$ de glicose-6-fosfato quando as concentrações de ATP e ADP são de $3,38 \text{ mM}$ e $1,32 \text{ mM}$, respectivamente? Esse processo de acoplamento produz uma via adequada, pelo menos em princípio, para a fosforilação da glicose na célula? Explique.

- (d) Embora o acoplamento da hidrólise de ATP à fosforilação de glicose faça sentido termodinamicamente, ainda não foi especificado como esse acoplamento ocorre. Dado que o acoplamento requer um intermediário comum, uma rota possível é o uso da hidrólise do ATP para elevar a concentração intracelular de P_i e, assim, impulsionar a fosforilação desfavorável da glicose por P_i . Essa rota é viável? (Considere o produto de solubilidade, K_{sp} , dos intermediários metabólicos.)
- (e) A fosforilação da glicose acoplada ao ATP é catalisada em hepatócitos pela enzima glicocinase. Essa enzima liga ATP e glicose, formando um complexo glicose-ATP-enzima, e o grupo fosforila é transferido diretamente do ATP para a glicose. Explique as vantagens dessa rota.

12. Cálculo da $\Delta G'^{\circ}$ para reações acopladas a ATP

Calcule, a partir dos dados da Tabela 13-6, o valor da $\Delta G'^{\circ}$ das seguintes reações:

- (a) Fosfocreatina + ADP \longrightarrow creatina + ATP
(b) ATP + frutose \longrightarrow ADP + frutose-6-fosfato

13. Acoplamento da hidrólise de ATP a uma reação desfavorável

Para explorar as consequências do acoplamento com a hidrólise de ATP sob condições fisiológicas sobre uma reação bioquímica termodinamicamente desfavorável, considere a transformação hipotética $\text{X} \longrightarrow \text{Y}$, que possui $\Delta G'^{\circ} = 20,0 \text{ kJ/mol}$.

- (a) Qual é a razão $[\text{Y}]/[\text{X}]$ no equilíbrio?
(b) Suponha que X e Y participem de uma sequência de reações durante a hidrólise de ATP em ADP e P_i . A reação total é



Calcule a relação $[Y]/[X]$ para essa reação no equilíbrio. Suponha que a temperatura seja 25°C e as concentrações de ATP, ADP, AMP e P_i no equilíbrio sejam 1 M.

- (c) Sabe-se que $[ATP]$, $[ADP]$ e $[P_i]$ em condições fisiológicas não são 1 M. Calcule $[Y]/[X]$ para a reação acoplada ao ATP quando os valores de $[ATP]$, $[ADP]$ e $[P_i]$ são aqueles encontrados nos miócitos de ratos (Tabela 13-5).

14. Cálculo da ΔG em concentrações fisiológicas Calcule o valor real de ΔG para a reação



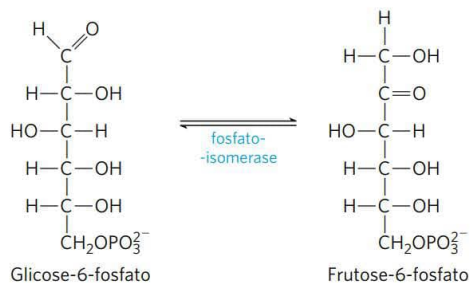
em 37°C, como acontece no citosol dos neurônios, com fosfocreatina em 4,7 mM, creatina em 1,0 mM, ADP em 0,73 mM e ATP 2,6 mM.

15. Energia livre necessária para a síntese de ATP em condições fisiológicas No citosol de hepatócitos de rato, a temperatura é 37°C e a relação entre a ação das massas, Q , é

$$\frac{[ATP]}{[ADP][P_i]} = 5,33 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$$

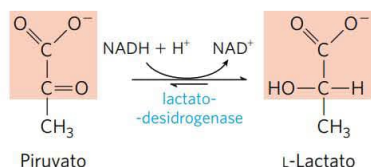
Calcule a energia livre necessária para a síntese de ATP em um hepatócito de rato.

16. Lógica química Na via glicolítica, um açúcar de seis carbonos (frutose-1,6-bisfosfato) é clivado para formar dois açúcares de três carbonos, que sofrem metabolismo adicional (ver Figura 14-6). Nesta via, ocorre isomerização da glicose-6-fosfato a frutose-6-fosfato (mostrada a seguir) dois passos antes da reação de clivagem (o passo seguinte é a fosforilação de frutose-6-fosfato a frutose-1,6-bisfosfato [p. 539]).



O que a isomerização faz a partir de uma perspectiva bioquímica? (Dica: considerar o que poderia acontecer se a ligação de clivagem C—C procedesse sem a isomerização.)

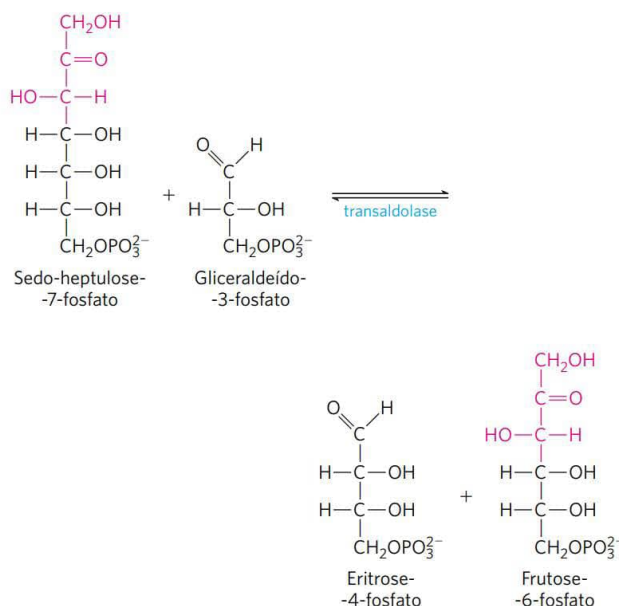
17. Mecanismos de reação enzimática I A lactato-desidrogenase é uma das muitas enzimas que necessitam de NADH como coenzima. Ela catalisa a conversão de piruvato em lactato:



Represente o mecanismo dessa reação (mostrando setas para a trajetória dos elétrons). (Dica: esta é uma reação comum por todo o metabolismo; o mecanismo é semelhante àquele catalisado por outras desidrogenases que usam NADH, como a álcool-desidrogenase.)

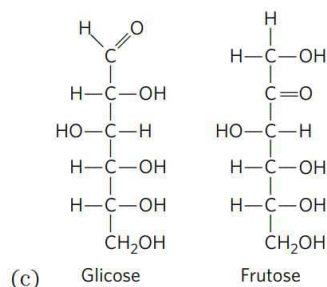
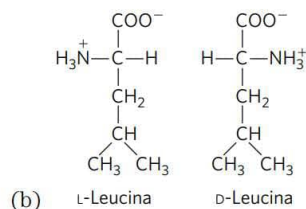
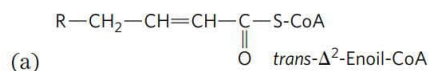
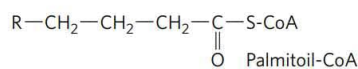
18. Mecanismos de reação enzimática II As reações bioquímicas geralmente parecem mais complicadas do que

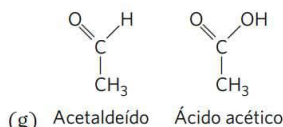
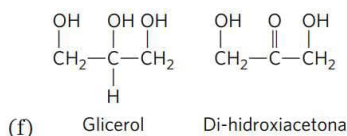
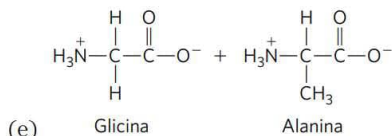
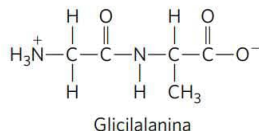
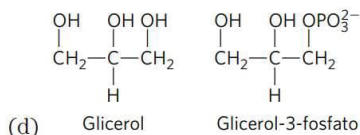
elas realmente o são. Na via das pentoses-fosfato (Capítulo 14), sedoheptulose-7-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato reagem, formando eritrose-4-fosfato e frutose-6-fosfato em uma reação catalisada pela transaldolase.



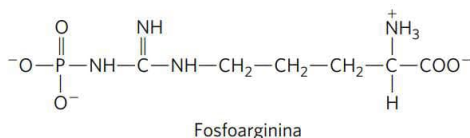
Represente um mecanismo para essa reação (mostrando a trajetória dos elétrons com setas). (Dica: revisar mais uma vez as condensações aldólicas e, então, considerar o nome dessa enzima.)

19. Reconhecimento dos tipos de reação Identifique, para cada par de biomoléculas, o tipo de reação (oxidação-redução, hidrólise, isomerização, transferência de grupo ou rearranjo interno) necessária para converter a primeira molécula na segunda. Indique, em cada caso, o tipo geral de enzima e de cofator(es) que são necessários e qualquer outro produto que seja formado.





20. Efeito da estrutura sobre o potencial de transferência de grupo Alguns organismos invertebrados possuem fosfoarginina. A energia livre padrão para a hidrólise dessa molécula é mais similar do que a da glicose-6-fosfato ou do ATP? Explique a sua resposta.



21. Polifosfato como uma possível fonte de energia A energia livre padrão para a hidrólise de polifosfato inorgânico (poliP) é cerca de -20 kJ/mol para cada P_i liberado. Foi calculado no Exemplo 13-2 que, em uma célula, são necessários 50 kJ/mol de energia para sintetizar ATP a partir de ADP e P_i . Seria factível que uma célula utilizasse polifosfato para sintetizar ATP a partir de ADP? Explique a sua resposta.

22. A utilização diária de ATP por seres humanos adultos

- (a) Um total de $30,5 \text{ kJ/mol}$ de energia livre é necessário para sintetizar ATP a partir de ADP e P_i quando os reagentes e produtos estão a concentrações de 1 M e a temperatura é de 25°C (estado-padrão). Uma vez que as concentrações fisiológicas de ATP, ADP e P_i não são 1 M e a temperatura é 37°C , a energia livre necessária para sintetizar ATP sob condições fisiológicas é diferente de ΔG° . Calcule a energia livre necessária para sintetizar ATP no hepatócito humano quando as concentrações fisiológicas de ATP, ADP e P_i forem de $3,5$, $1,5$ e $5,0 \text{ mM}$, respectivamente.
- (b) Um adulto de 68 kg requer uma ingesta calórica de 2.000 kcal (8.360 kJ) de alimento por dia (24 horas). O alimento

é metabolizado, e a energia livre é utilizada para sintetizar ATP, que, por sua vez, fornece energia para o trabalho químico e mecânico diário do corpo. Supondo que a eficiência de conversão da energia do alimento em ATP é de 50% , calcule a massa de ATP usada por um ser humano adulto em 24 horas . Qual a porcentagem da massa corporal que esse valor representa?

- (c) Embora indivíduos adultos sintetizem uma grande quantidade de ATP diariamente, a sua massa corporal, estrutura e composição não varia significativamente durante esse período. Explique essa aparente contradição.

23. Velocidade da reciclagem dos fosfatos γ e β do ATP Se uma quantidade pequena de ATP marcado com fósforo radiativo na posição terminal, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, for adicionada a um extrato de levedura, cerca de metade da radioatividade do ^{32}P é encontrada no P_i em poucos minutos, mas a concentração de ATP permanece inalterada. Explique. Se o mesmo experimento é realizado utilizando ATP marcado com ^{32}P na posição central, $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, o ^{32}P não aparece em P_i em tão curto período de tempo. Por quê?

24. A clivagem de ATP em AMP e PP_i durante o metabolismo A síntese da forma ativada do acetato (acetil-CoA) é realizada por um processo dependente de ATP:



- (a) A ΔG° para a hidrólise de acetil-CoA em acetato e CoA é $-32,2 \text{ kJ/mol}$ e para a hidrólise de ATP a AMP e PP_i é $-30,5 \text{ kJ/mol}$. Calcule a ΔG° para a síntese de acetil-CoA dependente de ATP.
- (b) Quase todas as células contêm a enzima pirofosfatase inorgânica, que catalisa a hidrólise de PP_i em P_i . Qual o efeito da presença dessa enzima na síntese de acetil-CoA? Explique.

25. Energia para o bombeamento de H^+ As células parietais que recobrem o estômago contêm “bombas” na membrana que transportam íons hidrogênio do citosol ($\text{pH } 7,0$) para o estômago, contribuindo para acidificar o suco gástrico ($\text{pH } 1,0$). Calcule a energia livre necessária para transportar 1 mol de íons hidrogênio por essas bombas. (Dica: consultar Capítulo 11.) Considere a temperatura de 37°C .

26. Potenciais de redução padrão O potencial de redução padrão, E° , de qualquer par *redox* é definido para a reação da semicélula:



Os valores de E° para o par *redox* conjugado NAD^+/NADH e piruvato/lactato são, respectivamente, $-0,32 \text{ V}$ e $-0,19 \text{ V}$.

- (a) Qual par *redox* apresenta a maior tendência em perder elétrons? Explique.
- (b) Qual é o agente oxidante mais forte? Explique.
- (c) Para qual das direções a reação seguirá começando com concentrações de 1 M de cada reagente e produto em $\text{pH } 7$ e 25°C ?



- (d) Qual a variação de energia livre padrão (ΔG°) para a conversão de piruvato em lactato?
- (e) Qual a constante de equilíbrio (K'_{eq}) para essa reação?

27. Extensão da energia da cadeia respiratória

A transferência de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial pode ser representada pela equação da reação global



- Calcule a $\Delta E'^{\circ}$ para a reação de transferência de elétrons líquida na mitocôndria. Use os valores de E'° apresentados na Tabela 13-7.
- Calcule a $\Delta G'^{\circ}$ dessa reação.
- Quantas moléculas de ATP podem *teoricamente* ser geradas por essa reação se a energia livre para a síntese de ATP nas condições celulares é de 52 kJ/mol?

28. Dependência da força eletromotriz sobre as concentrações

Calcule a força eletromotriz (em volts) registrada por um eletrodo imerso em uma solução contendo as seguintes misturas de NAD^+ e NADH em pH 7,0 e 25°C, com relação à semicélula de E'° 0,00 V.

- 1,0 mM NAD^+ e 10 mM NADH
- 1,0 mM NAD^+ e 1,0 mM NADH
- 10 mM NAD^+ e 1,0 mM NADH

29. A afinidade por elétrons dos compostos

Relacione as seguintes substâncias em ordem crescente de tendência em receber elétrons: (a) α -cetoglutarato + CO_2 (produzindo isocitrato); (b) oxalacetato; (c) O_2 ; (d) NADP^+ .

30. Sentido das reações de oxidação-redução

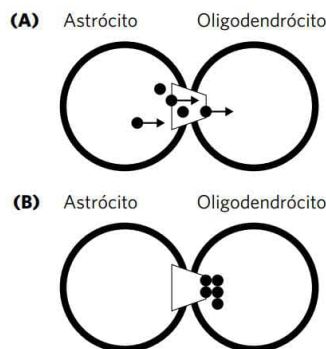
- Qual das reações a seguir se espera que ocorra no sentido representado, em condições-padrão, na presença das enzimas apropriadas?
- Malato + $\text{NAD}^+ \longrightarrow$ oxalacetato + $\text{NADH} + \text{H}^+$
 - Acetoacetato + $\text{NADH} + \text{H}^+ \longrightarrow$ β -hidroxibutirato + NAD^+
 - Piruvato + $\text{NADH} + \text{H}^+ \longrightarrow$ lactato + NAD^+
 - Piruvato + β -hidroxibutirato \longrightarrow lactato + acetoacetato
 - Malato + piruvato \longrightarrow oxalacetato + lactato
 - Acetaldeído + succinato \longrightarrow etanol + fumarato

Problema de análise de dados

31. A termodinâmica pode ser intrincada

A termodinâmica é uma área desafiadora de estudos que oferece muitas oportunidades para confusão. Um exemplo interessante é encontrado em um artigo dos pesquisadores Robinson, Hampson, Munro e Vaney, publicado no periódico *Science* em 1993. Robinson e colaboradores estudaram o movimento de pequenas moléculas entre células vizinhas do sistema nervoso, por meio de canais entre as células (junções tipo fenda). Eles demonstraram que o corante amarelo Lucifer (pequena molécula carregada negativamente) e a biocitina (pequena molécula zwitteriônica) movem-se em apenas um sentido entre dois tipos particulares de células da glia (célula não neuronal do sistema nervoso). O corante injetado em astrócitos passaria rapidamente para astrócitos, oligodendrócitos ou células de Müller vizinhas, mas o corante injetado em oligodendrócitos ou em células de Müller passaria lentamente, se passasse, para os astrócitos. Todos esses tipos celulares estão conectados por junções em hiato (fenda, “gap junction”).

Embora esse não tenha sido o ponto central do artigo, os autores apresentaram um modelo molecular de como esse transporte em sentido único deve ocorrer, como demonstrado em sua Figura 3:



Lê-se na legenda da figura: “Modelo de difusão do corante em sentido único entre oligodendrócitos e astrócitos acoplados, com base nas diferenças de diâmetro dos poros de conexão. Como um peixe em uma armadilha, as moléculas de corante (círculos pretos) passam de um astrócito para um oligodendrócito (A), mas não são capazes de voltar no sentido oposto (B)”.

Embora esse artigo tenha passado pela revisão de uma revista científica muito respeitada, foram enviadas várias cartas ao editor (1994), mostrando que o modelo de Robinson e colaboradores violava a segunda lei da termodinâmica.

- Explique como o modelo viola a segunda lei. Dica: considere o que aconteceria com a entropia do sistema com concentrações iniciais iguais de corante nos astrócitos e oligodendrócitos, conectados pelas junções tipo fenda semelhantes à “armadilha de peixe”.
- Explique por que esse modelo não funciona para moléculas pequenas, embora permita apanhar peixes.
- Explique por que uma armadilha de peixe *funciona* para peixes.
- Elabore dois mecanismos plausíveis para o transporte em sentido único das moléculas de corante entre as células que não violem a segunda lei da termodinâmica.

Referências

Letters to the editor. 1994. *Science* 265:1017–1019.
Robinson, S.R., E.C.G.M. Hampson, M.N. Munro e D.I. Vaney. 1993. Unidirectional coupling of gap junctions between neuroglia. *Science* 262:1072–1074.

Esta página foi deixada em branco intencionalmente.

Glicólise, gliconeogênese e a via das pentoses-fosfato

- 14.1 Glicólise 534
- 14.2 Vias alimentadoras da glicólise 548
- 14.3 Destinos do piruvato em condições anaeróbicas: fermentação 552
- 14.4 Gliconeogênese 558
- 14.5 Oxidação da glicose pela via das pentoses-fosfato 565

A glicose ocupa uma posição central no metabolismo de plantas, animais e muitos microrganismos. Ela é relativamente rica em energia potencial e, por isso, é um bom combustível; a oxidação completa da glicose a dióxido de carbono e água ocorre com uma variação da energia livre padrão de -2.840 kJ/mol . Por meio do armazenamento da glicose na forma de polímero de alta massa molecular, como o amido e o glicogênio, a célula pode estocar grandes quantidades de unidades de hexose enquanto mantém a osmolaridade citosólica relativamente baixa. Quando a demanda de energia aumenta, a glicose pode ser liberada desses polímeros de armazenamento intracelulares e utilizada para produzir ATP de maneira aeróbica ou anaeróbica.

A glicose, além de excelente combustível, também é um precursor admiravelmente versátil, capaz de suprir uma enorme variedade de intermediários metabólicos em reações biossintéticas. Uma bactéria, como a *Escherichia coli*, pode obter a partir da glicose os esqueletos carbônicos para cada aminoácido, nucleotídeo, coenzima, ácido graxo ou outro intermediário metabólico necessário para o seu crescimento. Um estudo abrangente dos destinos metabólicos da glicose compreenderia centenas ou milhares de transformações químicas. Em animais e em vegetais vasculares, a glicose tem quatro destinos principais: ela pode ser (1) usada na síntese de polissacarídeos complexos direcionados ao espaço extracelular; (2) armazenada nas células (como polissacarídeo ou como sacarose); (3) oxidada a compostos de três átomos de carbonos (piruvato) por meio da glicólise, para fornecer ATP e intermediários metabólicos; ou (4) oxidada pela via das pentoses-fosfato (fosfogliconato), produzindo ribose-5-fosfato para a síntese de ácidos nucleicos e NADPH para processos biossintéticos redutores (**Figura 14-1**).

Os organismos sem acesso à glicose de outras fontes devem sintetizá-la. Os organismos fotossintéticos sintetizam glicose inicialmente por redução do CO_2 atmosférico a trioses e, em seguida, por conversão das trioses em glicose. As células não fotossintéticas produzem glicose a partir de precursores simples com três ou quatro átomos de carbono pelo processo de gliconeogênese, que reverte a glicólise em uma via que utiliza muitas enzimas glicolíticas.

Este capítulo descreve as reações individuais da glicólise, da gliconeogênese e da via das pentoses-fosfato e o significado funcional de cada via. Descreve também os vários destinos metabólicos do piruvato produzido na glicólise. Entre eles, estão incluídas as fermentações, utilizadas por muitos organismos em nichos anaeróbicos para produzir ATP e industrialmente exploradas como fontes de etanol, ácido láctico e outros produtos úteis comercialmente. Além disso, o capítulo aborda as vias que disponibilizam vários açúcares a partir de mono, di e polissacarídeos para a via glicolítica. A discussão sobre o metabolismo da glicose continua no Capítulo 15, onde os processos de síntese e degradação de carboidratos são utilizados para ilustrar os diversos mecanismos pelos quais os organismos regulam as vias metabólicas. As vias biossintéticas que utilizam a glicose para a produção dos polissacarídeos da matriz extracelular e da parede celular e dos polissacarídeos de armazenamento são discutidas no Capítulo 20.

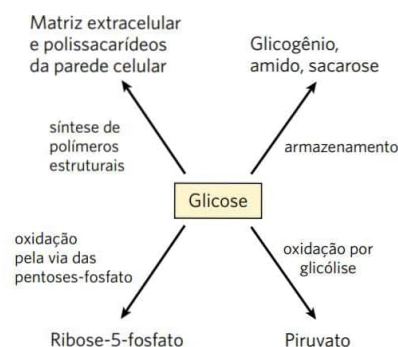


FIGURA 14-1 As principais vias de utilização da glicose. Embora não sejam os únicos destinos possíveis da glicose, essas quatro vias são as mais significativas em termos de quantidade de glicose que flui através delas na maioria das células.

14.1 Glicólise

Na **glicólise** (do grego, *glykys*, “doce” ou “açúcar”, e *lysis*, “quebra”), uma molécula de glicose é degradada em uma série de reações catalisadas por enzimas, gerando duas moléculas de um composto de três átomos de carbono, o piruvato. Durante as reações sequenciais da glicólise, parte da energia livre da glicose é conservada na forma de ATP e NADH. A glicólise foi a primeira via metabólica a ser elucidada e provavelmente seja a mais bem entendida. Desde a descoberta da fermentação, em 1897, por Eduard Buchner, em extratos obtidos de células de levedura, até a elucidação da via completa em leveduras (por Otto Warburg e Hans von Euler-Chelpin) e em músculo (por Gustav Embden e Otto Meyerhof), na década de 1930, as reações da glicólise foram um objetivo primário da pesquisa bioquímica. A mudança filosófica que acompanhou essas descobertas foi anunciada por Jacques Loeb em 1906:

Por meio da descoberta de Buchner, a biologia foi libertada de outro fragmento de misticismo. A cisão do açúcar em CO_2 e álcool não é mais o efeito de um “princípio vital”, mas sim a quebra do açúcar da cana pela invertase. A história desse problema é instrutiva, pois serve de alerta quanto a considerar problemas como algo além do nosso alcance porque ainda não tiveram uma solução.*

O desenvolvimento de métodos de purificação de enzimas, a descoberta e o reconhecimento da importância de coenzimas, como o NAD, e a descoberta do papel metabólico crucial do ATP e de outros compostos fosforilados resultaram dos estudos da glicólise. Enzimas glicolíticas de muitas espécies foram purificadas e minuciosamente estudadas.

A glicólise é uma via central quase universal do catabolismo da glicose, a via com o maior fluxo de carbono na maioria das células. A quebra glicolítica da glicose é a única fonte de energia metabólica em alguns tecidos e células de mamíferos (p. ex., eritrócitos, medula renal, cérebro e esperma). Alguns tecidos vegetais modificados para o armazenamento de amido (como os tubérculos da batata) e algumas plantas aquáticas (p. ex., agrião) derivam a maior parte de sua energia da glicólise; muitos microrganismos anaeróbicos são totalmente dependentes da glicólise.

Fermentação é um termo geral para a degradação *anaeróbica* da glicose ou de outros nutrientes orgânicos para obtenção de energia, conservada como ATP. Como os organismos vivos surgiram inicialmente em uma atmosfera sem oxigênio, a quebra anaeróbica da glicose provavelmente seja o mais antigo mecanismo biológico de obtenção de energia a partir de moléculas orgânicas combustíveis. O sequenciamento do genoma de vários organismos revelou que algumas arqueobactérias e alguns microrganismos parasitas são deficientes em uma ou mais enzimas da glicólise, mas possuem as enzimas essenciais da via; provavelmente



Hans Von Euler-Chelpin, 1873-1964
[Fonte: Austrian Archives/Corbis.]



Gustav Embden, 1874-1933



Otto Meyerhof, 1884-1951
[Fonte: Science Source.]

realizem formas variantes de glicólise. No curso da evolução, a sequência dessas reações químicas foi completamente conservada; as enzimas glicolíticas dos vertebrados são estreitamente similares, na sequência de aminoácidos e na estrutura tridimensional, às suas homólogas na levedura e no espinafre. A glicólise difere entre as espécies apenas nos detalhes de sua regulação e no destino metabólico subsequente do piruvato formado. Os princípios termodinâmicos e os tipos de mecanismos regulatórios que governam a glicólise são comuns a todas as vias do metabolismo celular. A via glicolítica, de importância central por si só, também pode servir de modelo para muitos aspectos das vias discutidas ao longo deste livro.

Antes de estudar cada etapa da via em seus detalhes, convém examinar a glicólise como um todo.

Uma visão geral: a glicólise tem duas fases

A quebra da glicose (formada por seis átomos de carbono) em duas moléculas de piruvato, cada uma com três carbonos, ocorre em 10 etapas, sendo que as primeiras 5 constituem a *fase preparatória* ou de *investimento* (**Figura 14-2a**). Nessas reações, a glicose é inicialmente fosforilada no grupo hidroxila ligado ao C-6 (etapa ①). A D-glicose-6-fosfato assim formada é convertida em D-frutose-6-fosfato (etapa ②), a qual é novamente fosforilada, desta vez no C-1, para formar D-frutose-1,6-bisfosfato (etapa ③). Nas duas reações de fosforilação, o ATP é o doador de grupos fosforila. Como todos os açúcares ou derivados formados na glicólise são isômeros D, omitiremos a designação D, exceto quando o objetivo for enfatizar sua estereoquímica.

A frutose-1,6-bisfosfato é dividida em duas moléculas de três carbonos, a di-hidroxiacetona-fosfato e o gliceraldeído-3-fosfato (etapa ④); essa é a etapa de “lise” que dá nome à via. A di-hidroxiacetona-fosfato é isomerizada a uma segunda molécula de gliceraldeído-3-fosfato (etapa ⑤), finalizando a primeira fase da glicólise. Observe que duas moléculas de ATP são consumidas antes da clivagem da glicose em duas partes de três carbonos; haverá depois um bom retorno para esse investimento. Resumindo: na fase preparatória da glicólise, a energia do ATP é consumida, aumentando o conteúdo de energia livre dos intermediários, e as cadeias de carbono de todas as hexoses metabolizadas são convertidas em um produto comum, o gliceraldeído-3-fosfato.

*Obtido de J. Loeb, *The Dynamics of Living Matter*, Columbia University Press, New York, 1906.

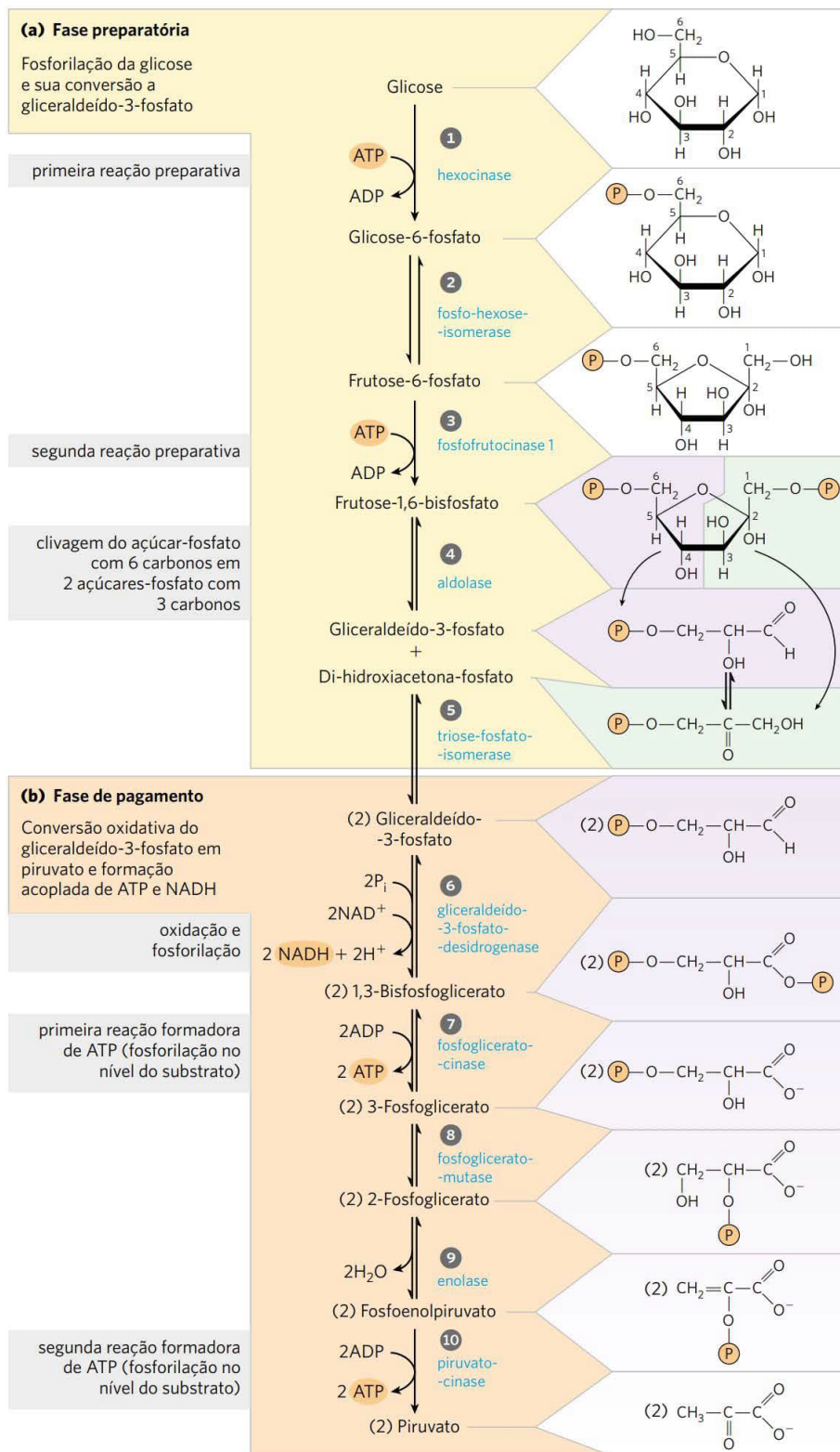


FIGURA 14-2 As duas fases da glicólise. Para cada molécula de glicose que passa pela fase preparatória **(a)**, duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato são formadas; as duas passam para a fase de pagamento **(b)**. O piruvato é o produto final da segunda fase da glicólise. Para cada molécula de glicose, dois ATP são consumidos na fase preparatória e quatro ATP são produzidos na fase de pagamento, dando um rendimento líquido de dois ATP por molécula de glicose convertida em piruvato. As reações numeradas correspondem aos títulos numerados discutidos no texto. Tenha em mente que cada grupo fosforila, representado aqui como P, possui duas cargas negativas ($-\text{PO}_3^{2-}$).

O ganho de energia provém da *fase de pagamento* da glicólise (Figura 14-2b). Cada molécula de gliceraldeído-3-fosfato é oxidada e fosforilada por fosfato inorgânico (*não* por ATP) para formar 1,3-bisfosfoglicerato (etapa 6). Ocorre liberação de energia quando as duas moléculas de 1,3-bisfosfoglicerato são convertidas em duas moléculas de piruvato (etapas 7 a 10). Grande parte dessa energia é conservada pela fosforilação acoplada de quatro moléculas de ADP a ATP. O rendimento líquido são duas moléculas de ATP por molécula de glicose utilizada, já que duas moléculas de ATP foram consumidas na fase preparatória. A energia também é conservada na fase de pagamento com a formação de duas moléculas do transportador de elétrons NADH por molécula de glicose.

Nas reações seguintes da glicólise, três tipos de transformações químicas são particularmente notáveis: (1) a degradação do esqueleto carbonado da glicose para produzir piruvato; (2) a fosforilação de ADP a ATP pelos compostos com alto potencial de transferência de grupos fosforila, formados durante a glicólise; e (3) a transferência de um íon hidreto para o NAD^+ , formando NADH. A lógica química global da via está descrita na **Figura 14-3**.

Destinos do piruvato Com exceção de algumas variações interessantes entre as bactérias, o piruvato formado na glicólise é metabolizado por três rotas catabólicas. Em organismos aeróbicos ou em tecidos em condições aeróbicas, a glicólise é apenas o primeiro estágio da degradação completa da glicose (**Figura 14-4**). O piruvato é oxidado, com a perda de seu grupo carboxila na forma de CO_2 , para gerar o grupo acetila da acetil-coenzima A; o grupo acetila é, então, completamente oxidado a CO_2 no ciclo do ácido cítrico (Capítulo 16). Os elétrons originados dessas oxidações são transferidos ao O_2 por uma cadeia de transportadores na mitocôndria, formando H_2O . A energia liberada nas reações de transferência de elétrons impulsiona a síntese de ATP na mitocôndria (Capítulo 19).

O segundo destino do piruvato é a sua redução a lactato por meio da **fermentação láctica**. Quando o músculo esquelético em contração vigorosa trabalha em condições de baixa pressão de oxigênio (**hipoxia**), o NADH não pode ser reoxidado a NAD^+ ; contudo, o NAD^+ é necessário como aceptor de elétrons para a oxidação do gliceraldeído-3-fosfato. Sob essas condições, o piruvato é reduzido a lactato, recebendo os elétrons do NADH, regenerando, dessa forma,

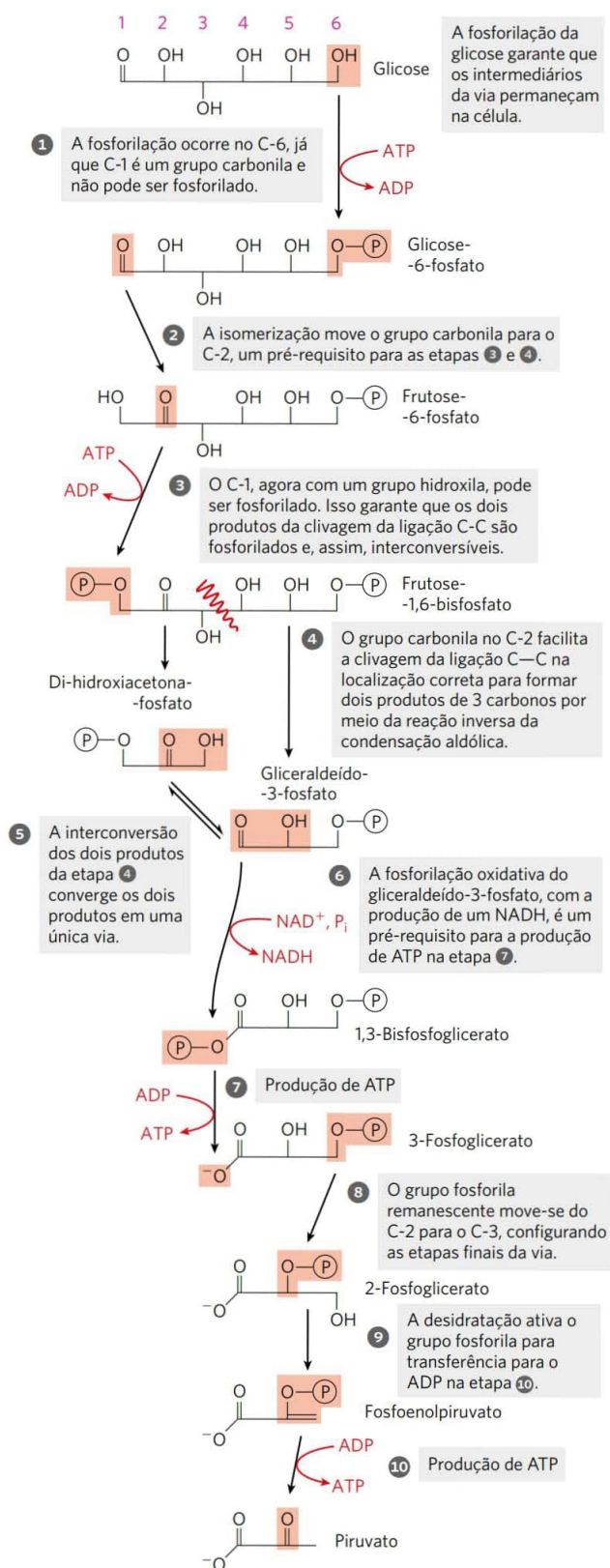


FIGURA 14-3 A lógica química da via glicolítica. Nesta versão simplificada da via, cada molécula está representada na forma linear, com os átomos de carbono e hidrogênio não mostrados, para salientar as transformações químicas. Lembre-se de que glicose e frutose estão presentes principalmente em suas formas cíclicas quando em solução, apesar de estarem transitoriamente na forma linear nos sítios ativos de algumas enzimas dessa via.

A fase preparatória, etapas 1 a 5, converte a glicose, com 6 átomos de carbono, em duas unidades de três átomos de carbono, cada uma delas fosforilada. A oxidação das unidades de três átomos de carbono é iniciada na fase de pagamento. Para produzir piruvato, as etapas químicas devem ocorrer na ordem mostrada.

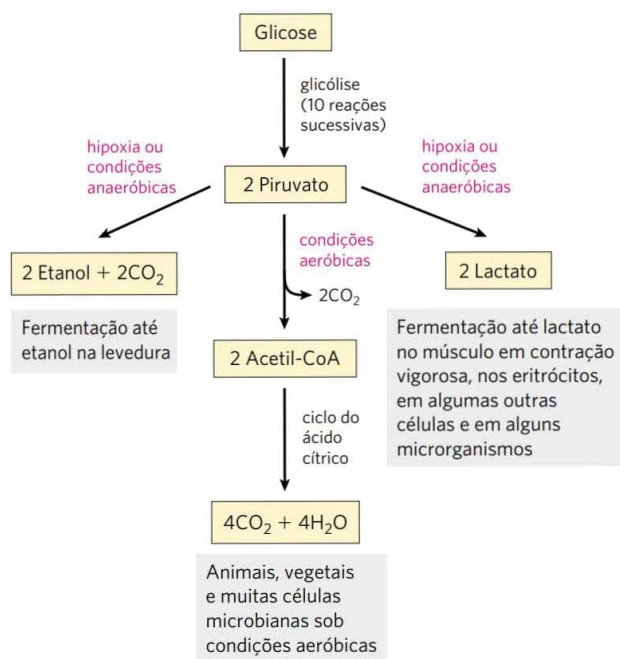


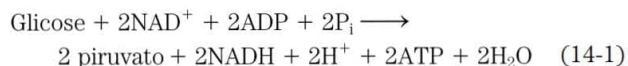
FIGURA 14-4 Os três destinos catabólicos possíveis do piruvato formado na glicólise. O piruvato também serve como precursor em muitas reações anabólicas, não mostradas aqui.

o NAD^+ necessário para continuar a glicólise. Certos tecidos e tipos celulares (p. ex., retina e eritrócitos) convertem glicose em lactato mesmo em condições aeróbicas, e o lactato também é o produto da glicólise em condições anaeróbicas em alguns microrganismos (Figura 14-4).

A terceira rota principal do catabolismo do piruvato leva à produção de etanol. Em alguns tecidos vegetais e em certos invertebrados, protistas e microrganismos, como as leveduras da fabricação da cerveja e do pão, o piruvato é convertido, em hipoxia ou em condições anaeróbicas, em etanol e CO_2 , um processo chamado de **fermentação etanólica (alcoólica)** (Figura 14-4).

A oxidação do piruvato é um processo catabólico importante, mas o piruvato também tem destinos anabólicos. Ele pode, por exemplo, prover o esqueleto carbonado para a síntese do aminoácido alanina ou para a síntese de ácidos graxos. Essas reações anabólicas do piruvato serão retomadas em capítulos posteriores.

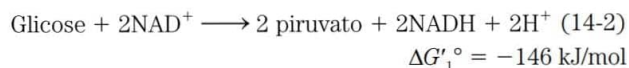
Formação de ATP e de NADH acoplada à glicólise Durante a glicólise, parte da energia da molécula de glicose é conservada na forma de ATP, ao passo que a maior parte permanece no produto, o piruvato. A equação geral da glicólise é



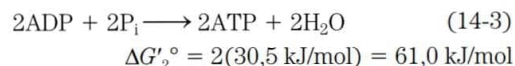
Para cada molécula de glicose degradada a piruvato, duas moléculas de ATP são geradas a partir de ADP e P_i , e duas moléculas de NADH são produzidas pela redução de NAD^+ .

O aceptor de hidrogênio nessa reação é o NAD^+ (ver Figura 13-24), ligado a uma estrutura de Rossmann, como mostrado na Figura 13-25. A redução de NAD^+ ocorre pela transferência enzimática de um íon hidreto (H^-) do grupo aldeído do gliceraldeído-3-fosfato para o anel de nicotinamida do NAD^+ , gerando a coenzima NADH reduzida. O outro átomo de hidrogênio da molécula de substrato é liberado para a solução como H^+ .

Agora, pode-se dividir a equação da glicólise em dois processos – a conversão de glicose a piruvato (exergônica):



e a formação de ATP a partir de ADP e P_i (endergônica):



A soma das equações 14-2 e 14-3 dá a variação geral de energia livre padrão para a glicólise, $\Delta G'_{\text{Somatório}}$:

$$\Delta G'_{\text{Somatório}} = \Delta G'_1 + \Delta G'_2 = -146 \text{ kJ/mol} + 61,0 \text{ kJ/mol} = -85 \text{ kJ/mol}$$

Sob condições-padrão e sob condições intracelulares (não padrão), a glicólise é um processo essencialmente irreversível, conduzido até a conclusão por um grande decréscimo líquido de energia livre.

Energia remanescente no piruvato A glicólise libera apenas uma pequena fração da energia total disponível na molécula de glicose; as duas moléculas de piruvato formadas pela glicólise ainda contêm a maior parte da energia potencial química existente na glicose, energia que pode ser extraída por reações oxidativas no ciclo do ácido cítrico (Capítulo 16) e na fosforilação oxidativa (Capítulo 19).

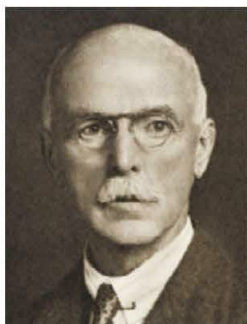
Importância dos intermediários fosforilados Cada um dos nove intermediários glicolíticos entre a glicose e o piruvato apresenta fosfato ligado (Figura 14-2). Os grupos fosforila parecem ter três funções.

1. Como a membrana plasmática geralmente não tem transportadores para açúcares fosforilados, os intermediários glicolíticos fosforilados não podem sair da célula. Depois da fosforilação inicial, não é necessária energia adicional para reter os intermediários fosforilados na célula, apesar da grande diferença entre as suas concentrações intra e extracelulares.
2. Os grupos fosforila são componentes essenciais na conservação enzimática da energia metabólica. A energia liberada na quebra das ligações de fosfoanidrido (como aquelas do ATP) é parcialmente conservada na formação de ésteres de fosfato, como glicose-6-fosfato. Compostos de fosfato de alta energia formados na glicólise (1,3-bisfosfoglicerato e fosfoenolpiruvato) doam grupos fosforila ao ADP para formar ATP.
3. A energia de ligação resultante do acoplamento de grupos fosfato ao sítio ativo de enzimas reduz

a energia de ativação e aumenta a especificidade das reações enzimáticas (Capítulo 6). Os grupos fosfato do ADP, do ATP e dos intermediários glicolíticos formam complexos com Mg^{2+} , e os sítios de ligação ao substrato de muitas enzimas glicolíticas são específicos para esses complexos. A maior parte das enzimas da glicólise requer Mg^{2+} para sua atividade.

A fase preparatória da glicólise requer ATP

Na fase preparatória da glicólise, duas moléculas de ATP são consumidas, e a cadeia carbonada da hexose é clivada em duas trioses-fosfato. A compreensão de que as hexoses *fosforiladas* são intermediárias na glicólise foi conseguida lentamente e por um feliz acaso. Em 1906, Arthur Harden e William Young testaram sua hipótese de que inibidores de enzimas proteolíticas estabilizariam as enzimas da fermentação da glicose em extratos de leveduras. Eles adicionaram soro sanguíneo (conhecido por conter inibidores de enzimas proteolíticas) a extratos de levedura e observaram o estímulo conforme esperado do metabolismo da glicose. No entanto, em um experimento-controle realizado com a intenção de demonstrar que ferver o soro destrói a atividade estimulante, eles descobriram que o soro fervido foi tão efetivo em estimular a glicólise quanto o soro não fervido. Exames cuidadosos e testes do conteúdo do soro fervido revelaram que o fosfato inorgânico foi o responsável pela estimulação. Harden e Young logo descobriram que a glicose adicionada ao seu extrato de levedura era convertida em uma hexose-bisfosfato (o “éster de Harden-Young”, identificado posteriormente como frutose-1,6-bisfosfato). Esse foi o início de uma longa série de investigações sobre o papel dos ésteres orgânicos e anidridos de fosfato em bioquímica, que levaram ao nosso entendimento atual do papel central da transferência de grupos fosforila em biologia.

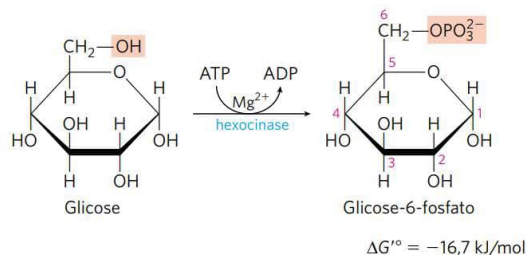


Arthur Harden, 1865-1940
[Fonte: Mary Evans Picture Library/Alamy.]



William Young, 1878-1942
[Fonte: cortesia do Medical History Museum, The University of Melbourne.]

1 Fosforilação da glicose Na primeira etapa da glicólise, a glicose é ativada para as reações subsequentes pela fosforilação em C-6, formando **glicose-6-fosfato**, com ATP como doador de grupo fosforila:

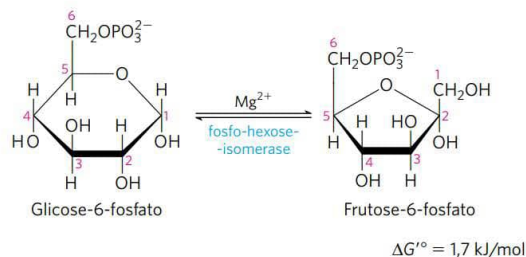


Essa reação, irreversível em condições intracelulares, é catalisada pela **hexocinase**. Lembre-se de que cinases são enzimas que catalisam a transferência do grupo fosforila terminal do ATP a um aceptor nucleofílico (ver Figura 13-20). As cinases são uma subclasse das transferases (ver Tabela 6-3). O aceptor no caso da hexocinase é uma hexose, geralmente a D-glicose, embora a hexocinase também catalise a fosforilação de outras hexoses comuns, como D-frutose e D-manose, em alguns tecidos.

A hexocinase, como muitas outras cinases, requer Mg^{2+} para sua atividade, já que o verdadeiro substrato da enzima não é ATP^{4-} , mas sim o complexo $MgATP^{2-}$ (ver Figura 13-12). O Mg^{2+} protege as cargas negativas dos grupos fosforila do ATP, tornando o átomo de fósforo terminal um alvo mais fácil para o ataque nucleofílico por um grupo $-OH$ da glicose. A hexocinase sofre uma profunda mudança na sua conformação, um ajuste induzido, quando ela se liga à molécula de glicose; dois domínios da proteína movem-se em cerca de 8 Å e aproximam-se um do outro quando o ATP se liga (ver Figura 6-26). Esse movimento aproxima o ATP de uma molécula de glicose também ligada à enzima e bloqueia o acesso de água (do solvente), que, caso contrário, poderia entrar no sítio ativo e atacar (hidrolisar) as ligações fosfoanidrido do ATP. Assim como as outras nove enzimas da glicólise, a hexocinase é uma proteína solúvel e citosólica.

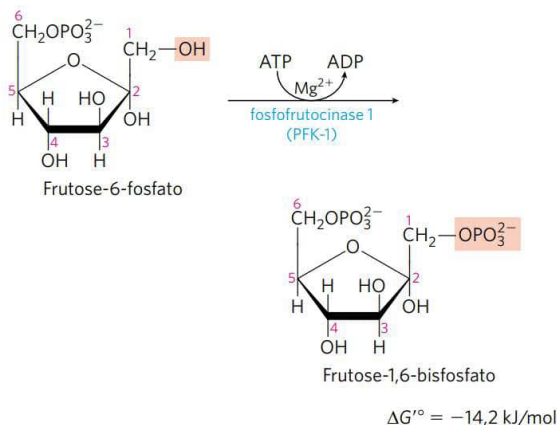
A hexocinase está presente em praticamente todos os organismos. O genoma humano codifica quatro hexocinases diferentes (I a IV), e todas elas catalisam a mesma reação. Duas ou mais enzimas que catalisam a mesma reação, mas são codificadas por genes diferentes, são chamadas de **isoenzimas** (ver Quadro 15-2). Uma das isoenzimas presente em hepatócitos, a hexocinase IV (também chamada de glicocinase), difere de outras formas de hexocinase com relação à cinética e às propriedades regulatórias, com consequências fisiológicas importantes, descritas na Seção 15.3.

2 Conversão de glicose-6-fosfato em frutose-6-fosfato A enzima **fosfo-hexose-isomerase (fosfoglicose-isomerase)** catalisa a isomerização reversível da glicose-6-fosfato (aldose) a **frutose-6-fosfato** (cetose):



O mecanismo dessa reação envolve um intermediário enediol (**Figura 14-5**). A reação ocorre facilmente em ambos os sentidos, como previsto pela variação relativamente pequena da energia livre padrão.

3 Fosforilação da frutose-6-fosfato a frutose-1,6-bisfosfato Na segunda das duas reações preparatórias da glicólise, a enzima **fosfofrutocinase 1 (PFK-1)** catalisa a transferência de um grupo fosforila do ATP para a frutose-6-fosfato, formando **frutose-1,6-bisfosfato**:

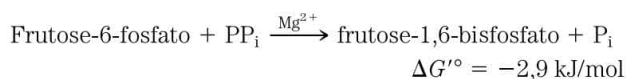


>> Convenção-chave: compostos com dois grupos fosfato ou fosforila ligados em diferentes posições da molécula são chamados de *bisfosfatos* (ou compostos *bisfosfo*); por exemplo, frutose-1,6-bisfosfato e 1,3-bisfosfoglicerato.

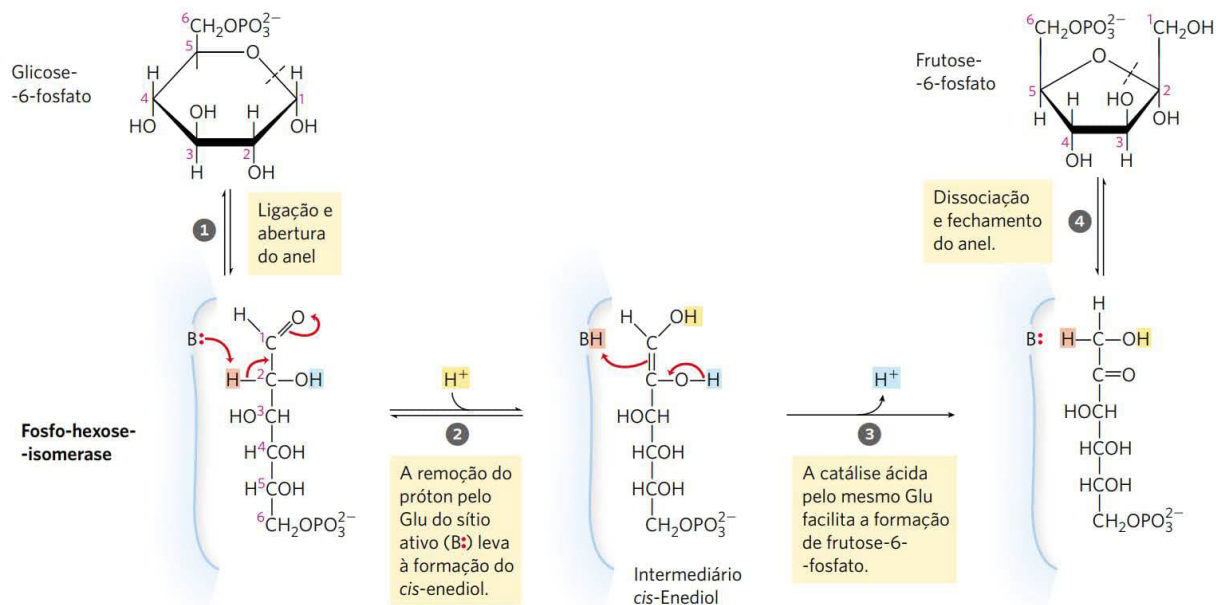
Compostos com dois fosfatos ligados como grupo pirofosforila são chamados de *difosfatos*; por exemplo, adenosina-difosfato (ADP). Regras semelhantes são aplicadas para nomear *trisfosfatos* (como inositol-1,4,5-trisfosfato; ver p. 451) e *trisfosfatos* (como adenosina-trisfosfato, ATP). <<

A enzima que forma a frutose-1,6-bisfosfato é chamada de PFK-1, para distingui-la de uma segunda enzima (PFK-2), que catalisa a formação de frutose-2,6-bisfosfato a partir de frutose-6-fosfato em uma via distinta (os papéis da PFK-2 e da frutose-2,6-bisfosfato são discutidos no Capítulo 15). A reação da PFK-1 é essencialmente irreversível em condições celulares, e essa é a primeira etapa “comprometida” da via glicolítica; a glicose-6-fosfato e a frutose-6-fosfato têm outros destinos possíveis, mas a frutose-1,6-bisfosfato é direcionada para a glicólise.

Certos protistas e bactérias têm, e talvez todos os vegetais tenham, uma fosfofrutocinase que utiliza pirofosfato (PP_i), não ATP, como doador do grupo fosforila na síntese de frutose-1,6-bisfosfato:



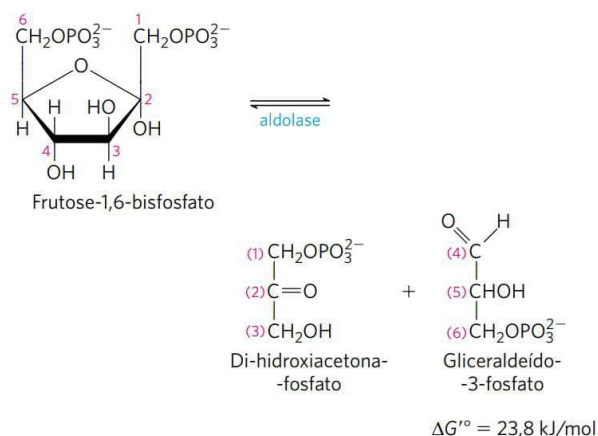
A fosfofrutocinase 1 está sujeita a uma complexa modulação alostérica; sua atividade estará aumentada sempre que o suprimento de ATP da célula estiver diminuído ou quando ocorrer acúmulo dos produtos da degradação de ATP, ADP e AMP (particularmente o último). A enzima estará inibida sempre que a célula tiver muito ATP e estiver bem suprida por outro combustível, como ácidos graxos.



MECANISMO-FIGURA 14-5 A reação da fosfo-hexose-isomerase. As reações de abertura e fechamento do anel (etapas 1 e 4) são catalisadas por um resíduo de His do sítio ativo, por mecanismos omitidos aqui para simplificação. O próton (em vermelho-claro) inicialmente no C-2 torna-se mais facilmente removível pela retirada do elétron pelo grupo carbonila adjacente e pelos grupos hidroxila vizinhos. Após sua transferência do C-2 para o resíduo de Glu do sítio ativo (um ácido fraco), o próton é livremente trocado com a solução ao redor; ou seja, o próton removido do C-2 na etapa 2 não é necessariamente o mesmo adicionado ao C-1 na etapa 3.

Em alguns organismos, a frutose-2,6-bisfosfato (não confundir com o produto da reação com PFK-1, a frutose-1,6-bisfosfato) é um ativador alostérico potente da PFK-1. A ribulose-5-fosfato, intermediário da via das pentoses-fosfato, discutida posteriormente neste capítulo, também ativa indiretamente a fosfofrutocinase. As múltiplas esferas de regulação dessa etapa da glicólise serão discutidas em detalhes no Capítulo 15.

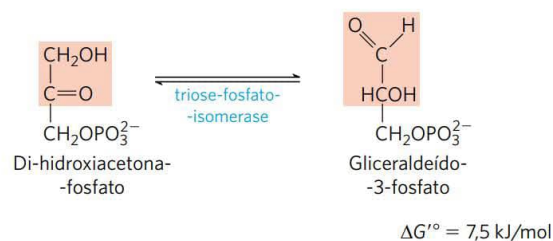
4 Clivagem da frutose-1,6-bisfosfato A enzima **frutose-1,6-bisfosfato-aldolase**, muitas vezes chamada simplesmente de **aldolase**, catalisa uma condensação aldólica reversível (ver Figura 13-4). A frutose-1,6-bisfosfato é clivada para a formação de duas trioses-fosfato diferentes, a aldose **gliceraldeído-3-fosfato** e a cetose **di-hidroxiacetona-fosfato**:



Existem duas classes de aldolases. As aldolases da classe I, encontradas em animais e vegetais, utilizam o mecanismo mostrado na Figura 14-6. As enzimas da classe II, de fungos e bactérias, não formam a base de Schiff intermediária. Em vez disso, um íon zinco no sítio ativo está coordenado com o oxigênio do grupo carbonila em C-2; o Zn^{2+} polariza o grupo carbonila e estabiliza o intermediário enolato gerado na etapa de clivagem da ligação C—C (ver Figura 6-19).

Embora a reação da aldolase tenha uma variação da energia livre padrão fortemente positiva no sentido de clivar a frutose-1,6-bisfosfato, nas baixas concentrações dos reagentes presentes na célula a variação real da energia livre é pequena, e a reação da aldolase é prontamente reversível. Será visto posteriormente que a aldolase age no sentido reverso durante o processo de gliconeogênese (ver Figura 14-17).

5 Interconversão das trioses-fosfato Apenas uma das duas trioses-fosfato formadas pela aldolase, o gliceraldeído-3-fosfato, pode ser diretamente degradada nas etapas subsequentes da glicólise. O outro produto, a di-hidroxiacetona-fosfato, é rápida e reversivelmente convertida em gliceraldeído-3-fosfato pela quinta enzima da sequência glicolítica, a **triose-fosfato-isomerase**:



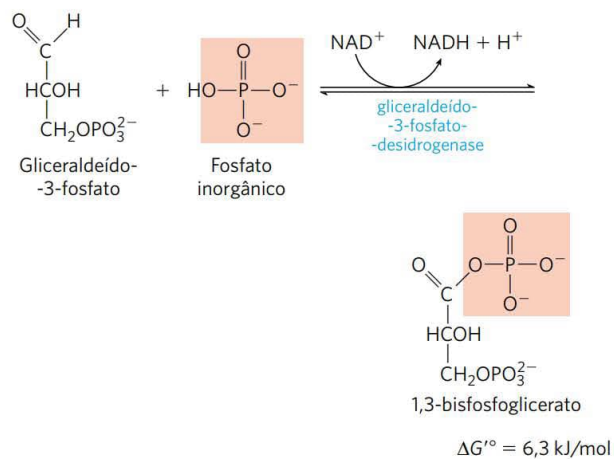
O mecanismo de reação é semelhante ao da reação promovida pela fosfo-hexose-isomerase na etapa 2 da glicólise (Figura 14-5). Depois da reação da triose-fosfato-isomerase, os átomos de carbono derivados de C-1, C-2 e C-3 da glicose inicial são quimicamente indistinguíveis de C-6, C-5 e C-4, respectivamente (Figura 14-7); as duas “metades” da glicose geram gliceraldeído-3-fosfato.

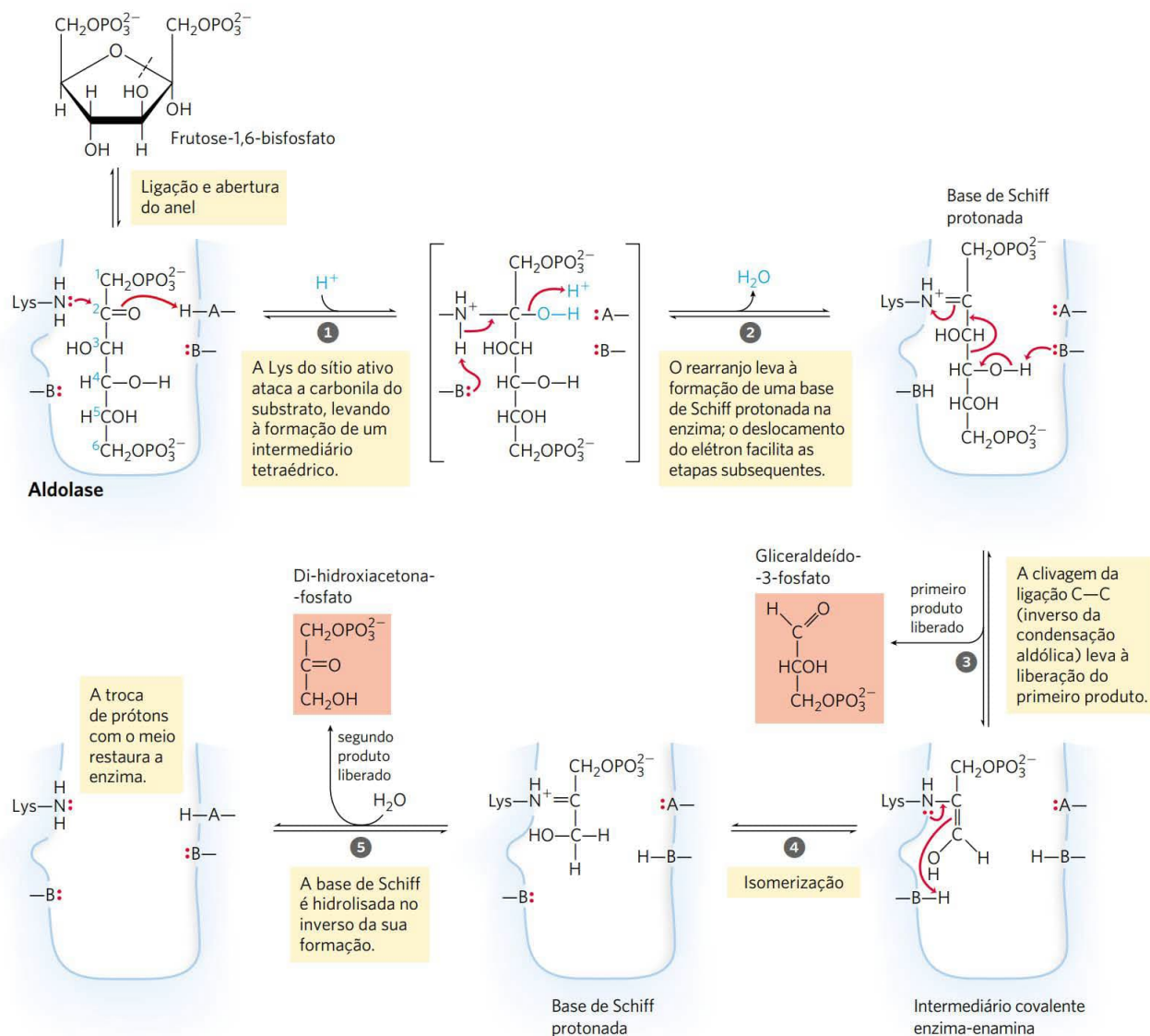
Essa reação completa a fase preparatória da glicólise. A molécula de hexose foi fosforilada no C-1 e no C-6 e, então, clivada para formar duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato.

A fase de pagamento da glicólise produz ATP e NADH

A fase de pagamento da glicólise (Figura 14-2b) inclui as etapas de fosforilação que conservam energia, nas quais parte da energia química da molécula da glicose é conservada na forma de ATP e NADH. Lembre-se de que uma molécula de glicose rende duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato, e as duas metades da molécula de glicose seguem a mesma via na segunda fase da glicólise. A conversão das duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato em duas moléculas de piruvato é acompanhada pela formação de quatro moléculas de ATP a partir de ADP. No entanto, o rendimento líquido de ATP por molécula de glicose consumida é de apenas dois, já que dois ATP foram investidos na fase preparatória da glicólise para fosforilar as duas extremidades da molécula da hexose.

6 Oxidação do gliceraldeído-3-fosfato a 1,3-bisfosfoglicerato A primeira etapa da fase de pagamento é a oxidação do gliceraldeído-3-fosfato a **1,3-bisfosfoglicerato**, catalisada pela enzima **gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase**:





MECANISMO-FIGURA 14-6 A reação da aldolase de classe I. A reação mostrada aqui é o inverso de uma condensação aldólica. Observe que a clivagem entre C-3 e C-4 depende da presença do grupo carbonila em C-2, que é convertido em uma imina no sítio ativo da enzima. A e B representam os resíduos de aminoácidos que servem como ácido (A) ou base (B).

Esta é a primeira das duas reações de conservação de energia da glicólise que eventualmente levam à formação de ATP. O grupo aldeído do gliceraldeído-3-fosfato é oxidado, não em um grupo carboxila livre, mas em um anidrido de ácido carboxílico com ácido fosfórico. Esse tipo de anidrido, chamado de **acil-fosfato**, tem energia livre padrão de hidrólise muito alta ($\Delta G'^{\circ} = -49,3 \text{ kJ/mol}$; ver Figura 13-14, Tabela 13-6). A maior parte da energia livre de oxidação do grupo aldeído do gliceraldeído-3-fosfato é conservada pela formação do grupo acil-fosfato no C-1 do 1,3-bisfosfoglicerato.

O gliceraldeído-3-fosfato é covalentemente ligado à desidrogenase durante a reação (**Figura 14-8**). O grupo aldeído do gliceraldeído-3-fosfato reage com o grupo —SH de um resíduo de Cys essencial no sítio ativo, em reação análoga à formação de um hemiacetal (ver Figura 7-5), nesse caso produzindo um *tio*-hemiacetal. A reação do resíduo de Cys essencial com um metal pesado, como o Hg^{2+} , inibe a enzima irreversivelmente.

A quantidade de NAD^+ em uma célula ($\leq 10^{-5} \text{ M}$) é muito menor que a quantidade de glicose metabolizada em poucos minutos. A via glicolítica pararia se o NADH formado

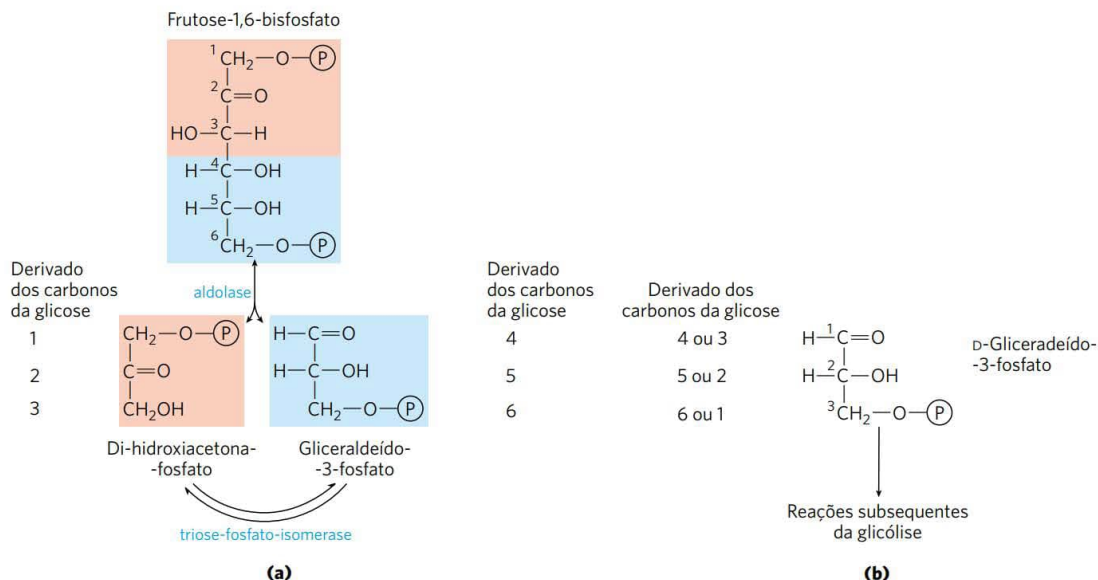
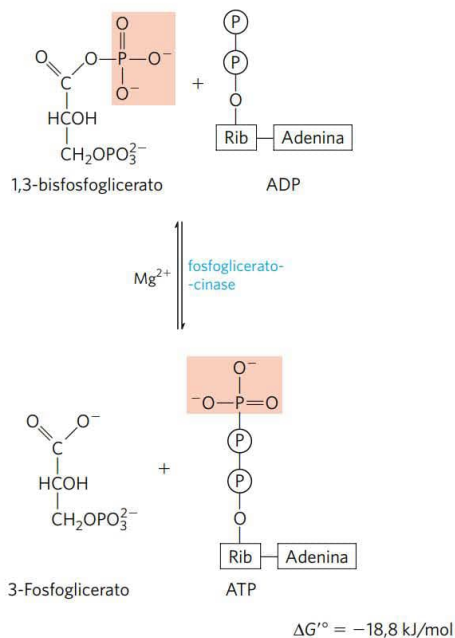


FIGURA 14-7 Destino dos carbonos da glicose na formação de gliceraldeído-3-fosfato. (a) A origem dos carbonos nos dois compostos de três carbonos produzidos nas reações da aldolase e da triose-fosfato-isomerase. O produto final das duas reações é gliceraldeído-3-fosfato (duas moléculas). (b) Cada carbono do gliceraldeído-3-fosfato é derivado de um ou outro de dois átomos de carbono específicos da glicose. Observe que a numeração dos átomos de carbono do gliceraldeído-3-fosfato difere daquela da glicose da qual ele é derivado. No gliceraldeído-3-fosfato, o grupo funcional mais complexo (o grupo carbonila) é especificado como C-1. Esta troca de numeração é importante para interpretar os experimentos com glicose em que um único carbono é marcado com um radioisótopo. (Ver Problemas 6 e 9 no final deste capítulo.)

nesta etapa da glicólise não fosse continuamente reoxidado e reciclado. A discussão sobre a reciclagem de NAD^+ será retomada posteriormente neste capítulo.

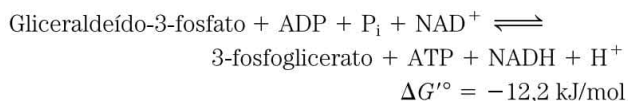
7 Transferência de uma fosforila do 1,3-bisfosfoglicerato para o ADP

A enzima **fosfoglicerato-cinase** transfere o grupo fosforila de alta energia do grupo carboxila do 1,3-bisfosfoglicerato para o ADP, formando ATP e **3-fosfoglicerato**:



Observe que a fosfoglicerato-cinase tem esse nome devido à reação inversa, na qual ocorre a transferência de um grupo fosforila do ATP para o 3-fosfoglicerato. Como todas as enzimas, ela catalisa a reação em ambos os sentidos. Essa enzima age no sentido sugerido pelo seu nome durante a gliconeogênese (ver Figura 14-17) e durante a assimilação de CO_2 fotossintético (ver Figura 20-31). Na glicólise, a reação que ela catalisa prossegue como mostrado anteriormente, no sentido da síntese de ATP.

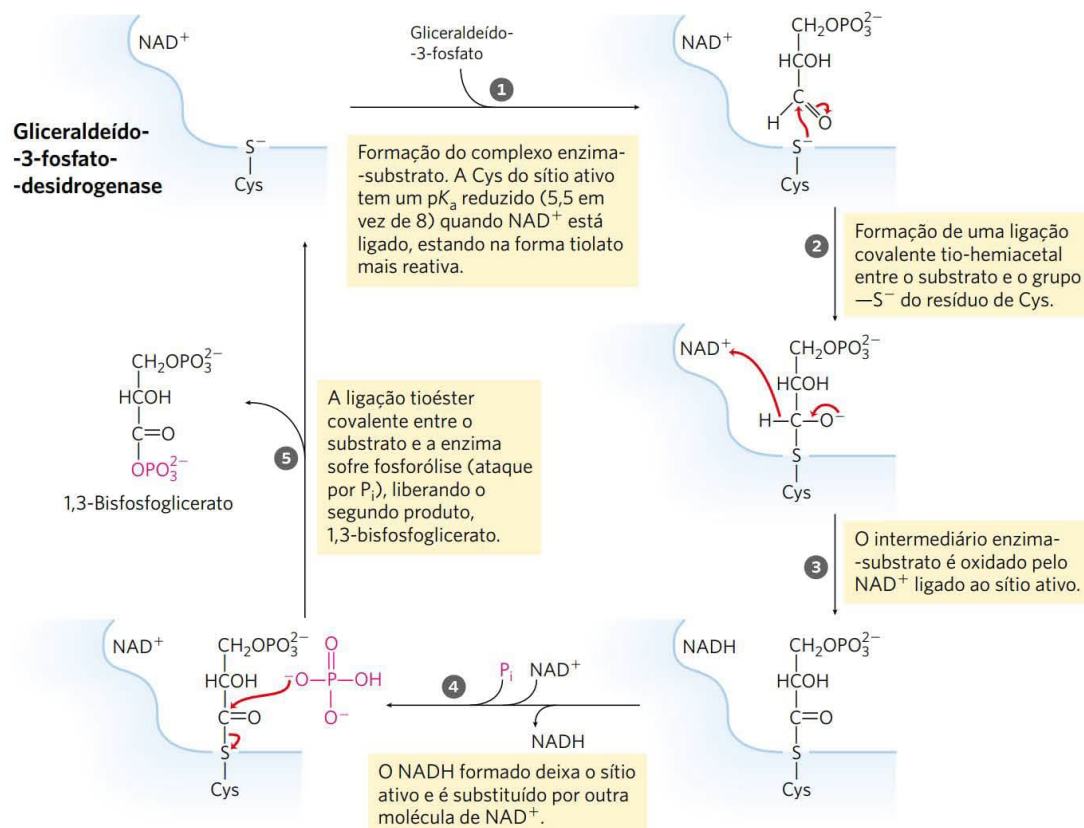
As etapas 6 e 7 da glicólise constituem um processo de acoplamento de energia em que 1,3-bisfosfoglicerato é o intermediário comum; ele é formado na primeira reação (que seria endergônica se isolada) e seu grupo acil-fosfato é transferido ao ADP na segunda reação (que é fortemente exergônica). A soma dessas duas reações é



Portanto, a reação global é exergônica.

Lembre-se, do Capítulo 13, de que a variação de energia livre real, ΔG , é determinada pela variação de energia livre padrão, $\Delta G'^{\circ}$, e pela lei da ação das massas, Q , que é a relação [produtos]/[reagentes] (ver Equação 13-4). Para a etapa 6:

$$\Delta G = \Delta G'^{\circ} + RT \ln Q \\ = \Delta G'^{\circ} + RT \ln \frac{[\text{1,3-bisfosfoglicerato}][\text{NADH}]}{[\text{gliceraldeído-3-fosfato}][\text{P}_i][\text{NAD}^+]}$$



MECANISMO-FIGURA 14-8 A reação da gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase.

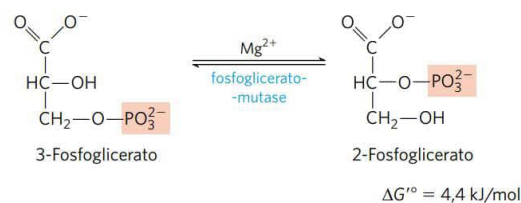
Observe que a $[H^+]$ não está incluída em Q . Em cálculos bioquímicos, a $[H^+]$ é considerada uma constante (10^{-7} M), e essa constante está incluída na definição de $\Delta G'^{\circ}$ (p. 498).

Quando a lei da ação das massas é menor que 1,0, seu logaritmo natural tem sinal negativo. No citosol, onde essas reações ocorrem, a razão $[NADH]/[NAD^+]$ é pequena, contribuindo para um baixo valor de Q . A etapa 7, por consumir o produto da etapa 6 (1,3-bisfosfoglicerato), mantém a $[1,3\text{-bisfosfoglicerato}]$ relativamente baixa no estado estacionário e, assim, mantém Q pequeno para o processo global de acoplamento de energia. Quando Q é pequeno, a contribuição de $\ln Q$ pode tornar ΔG fortemente negativo. Essa é simplesmente outra forma de mostrar como as duas reações, as etapas 6 e 7, são acopladas por meio de um intermediário comum.

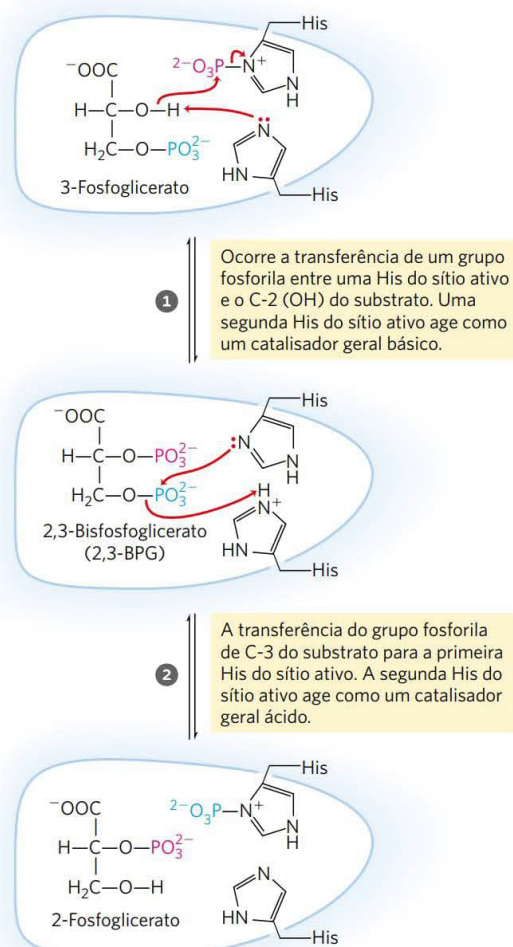
O resultado do acoplamento dessas reações, ambas reversíveis em condições celulares, é que a energia liberada da oxidação de um aldeído a um grupo carboxilato é conservada pela formação acoplada de ATP a partir de ADP e P_i . A formação de ATP pela transferência do grupo fosforila de um substrato, como o 1,3-bisfosfoglicerato, é chamada de **fosforilação no nível do substrato**, para distinguir esse mecanismo daquele da **fosforilação ligada à respiração**. As fosforilações no nível do substrato envolvem enzimas solúveis e intermediários químicos (nesse caso, 1,3-bisfosfoglicerato). As fosforilações ligadas à respiração, por outro

lado, envolvem enzimas ligadas à membrana e gradientes transmembrana de prótons (Capítulo 19).

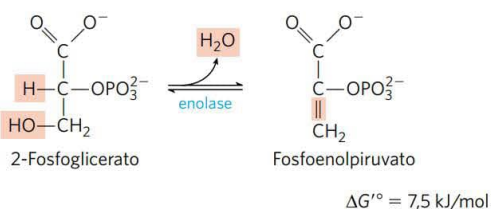
8 Conversão de 3-fosfoglicerato em 2-fosfoglicerato A enzima **fosfoglicerato-mutase** catalisa o deslocamento reversível do grupo fosforila entre C-2 e C-3 do glicerato; o Mg^{2+} é essencial para essa reação:



A reação ocorre em duas etapas (Figura 14-9). O grupo fosforila inicialmente acoplado a um resíduo de His da mutase é transferido a um grupo hidroxila em C-2 do 3-fosfoglicerato, formando 2,3-bisfosfoglicerato (2,3-BPG). O grupo fosforila no C-3 do 2,3-BPG é, então, transferido para o mesmo resíduo de His, produzindo 2-fosfoglicerato e regenerando a enzima fosforilada. A fosfoglicerato-mutase é inicialmente fosforilada pela transferência de uma fosforila do 2,3-BPG, o que é necessário em pequenas quantidades para iniciar o ciclo catalítico e é continuamente regenerado por esse ciclo.

Fosfoglicerato-mutase**MECANISMO-FIGURA 14-9 A reação da fosfoglicerato-mutase.****9 Desidratação do 2-fosfoglicerato produzindo fosfoenolpiruvato**

Na segunda reação glicolítica que gera um composto com alto potencial de transferência de grupamento fosforila (a primeira foi a etapa 6), a **enolase** promove a remoção reversível de uma molécula de água do 2-fosfoglicerato para gerar **fosfoenolpiruvato (PEP)**:

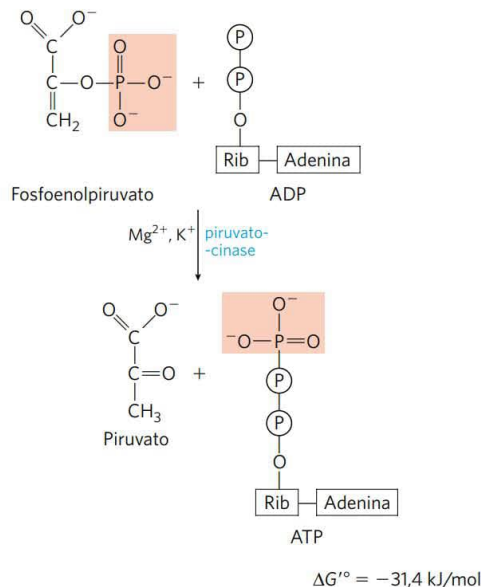


O mecanismo da reação da enolase envolve um intermediário enólico estabilizado por Mg^{2+} (ver Figura 6-27). A reação converte um composto com relativamente baixo potencial de transferência de grupo fosforila (o ΔG° para a hidrólise de 2-fosfoglicerato é $-17,6 \text{ kJ/mol}$) para um com

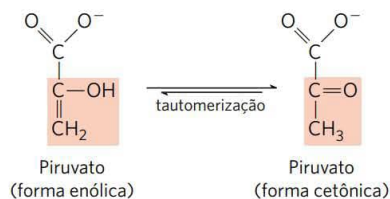
alto potencial de transferência de grupo fosforila (o ΔG° para a hidrólise de PEP é $-61,9 \text{ kJ/mol}$) (ver Figura 13-13, Tabela 13-6).

10 Transferência do grupo fosforila do fosfoenolpiruvato para o ADP

A última etapa na glicólise é a transferência do grupo fosforila do fosfoenolpiruvato ao ADP, catalisada pela **piruvato-cinase**, que exige K^+ e Mg^{2+} ou Mn^{2+} :



Nesta fosforilação no nível do substrato, o **piruvato** resultante aparece inicialmente em sua forma enólica, depois tautomeriza de modo rápido e não enzimático à sua forma cetônica, que predomina em pH 7,0:

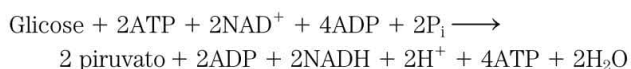


A reação global tem grande variação negativa da energia livre padrão, devido, em grande parte, à conversão espontânea da forma enólica do piruvato à forma cetônica (ver Figura 13-13). Aproximadamente metade da energia liberada pela hidrólise do PEP ($\Delta G^\circ = -61,9 \text{ kJ/mol}$) é conservada na formação da ligação fosfoanidrido do ATP ($\Delta G^\circ = -30,5 \text{ kJ/mol}$), e o restante ($-31,4 \text{ kJ/mol}$) constitui uma grande força que empurra a reação no sentido da síntese de ATP. A regulação da piruvato-cinase será discutida no Capítulo 15.

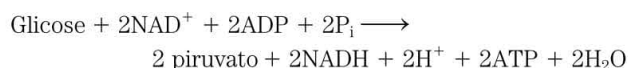
O balanço geral mostra um ganho líquido de ATP

Agora, pode-se construir um balanço da glicólise para demonstrar (1) o destino do esqueleto de carbono da glicose, (2) a entrada de P_i e ADP e a saída de ATP e (3) o caminho dos elétrons nas reações de oxidação-redução. O lado esquerdo da equação que se segue mostra todas as entradas

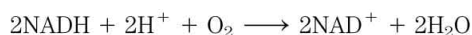
de ATP, NAD^+ , ADP e P_i (ver Figura 14-2), e o lado direito mostra todas as saídas (lembre-se de que cada molécula de glicose rende duas moléculas de piruvato):



Cancelando os termos comuns nos dois lados da equação, é obtida a equação global para a glicólise em condições aeróbicas:



As duas moléculas de NADH formadas pela glicólise no citosol são, em condições aeróbicas, reoxidadas a NAD^+ pela transferência de seus elétrons para a cadeia de transporte de elétrons, que, em células eucarióticas, está localizada na mitocôndria. A cadeia de transporte de elétrons conduz esses elétrons para o seu destino final, o O_2 :



A transferência de elétrons do NADH para o O_2 na mitocôndria fornece a energia para a síntese de ATP pela fosforilação ligada à respiração (Capítulo 19).

No processo glicolítico em geral, uma molécula de glicose é convertida em duas moléculas de piruvato (a via do carbono). Duas moléculas de ADP e duas de P_i são convertidas em duas moléculas de ATP (a via dos grupos fosforila). Quatro elétrons, na forma de dois íons hidreto, são transferidos de duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato para duas de NAD^+ (a via dos elétrons).

A glicólise é precisamente regulada

Durante seus estudos sobre a fermentação da glicose por leveduras, Louis Pasteur descobriu que tanto a velocidade quanto a quantidade total de glicose consumida é muitas vezes maior em condições anaeróbicas do que em aeróbicas. Estudos posteriores com músculo confirmaram a grande variação nas taxas da glicólise anaeróbica e aeróbica. As bases bioquímicas para esse “efeito Pasteur” agora estão claras. O rendimento de ATP da glicólise em condições anaeróbicas (2 ATP por molécula de glicose) é muito menor do que aquele a partir da oxidação completa da glicose a CO_2 em condições aeróbicas (30 ou 32 ATP por glicose; ver Tabela 19-5). Portanto, para produzir a mesma quantidade de ATP, é necessário consumir cerca de 15 vezes mais glicose em condições anaeróbicas do que em condições aeróbicas.

O fluxo de glicose pela via glicolítica é regulado para manter os níveis de ATP praticamente constantes (assim como quantidades adequadas dos intermediários glicolíticos que possuem papéis biossintéticos). O ajuste necessário na velocidade da glicólise é alcançado pela interação complexa entre o consumo de ATP, a regeneração de NADH e a regulação alostérica de algumas enzimas glicolíticas – incluindo a hexocinase, a PFK-1 e a piruvato-cinase – e as flutuações segundo a segunda das concentrações dos metabólitos-chave que refletem o equilíbrio celular entre a produção e o consumo de ATP. Em uma escala de tempo um pouco maior, a glicólise é regulada pelos hormônios glucagon, adrenali-

na e insulina e por variações na expressão de genes de várias enzimas glicolíticas. Um caso especialmente interessante é a **glicólise aeróbica** em tumores. O bioquímico alemão Otto Warburg foi o primeiro, em 1928, a observar que tumores de praticamente todos os tipos possuem velocidade da glicólise muito maior que a de tecidos normais, *mesmo quando oxigênio está disponível*. Esse “efeito Warburg” é a base de vários métodos de detecção e tratamento do câncer (Quadro 14-1).



Otto Warburg, 1883-1970
[Fonte: Science Photo Library/Science Source.]

Warburg é considerado o bioquímico mais importante da primeira metade do século XX. Ele fez contribuições inspiradoras em muitas outras áreas da bioquímica, incluindo respiração, fotossíntese e enzimologia do metabolismo intermediário. Iniciando em 1930, Warburg e colaboradores purificaram e cristalizaram sete enzimas da glicólise. A equipe de Warburg desenvolveu uma ferramenta experimental que revolucionou os estudos bioquímicos do metabolismo oxidativo: o manômetro de Warburg, que mede diretamente o consumo de oxigênio dos tecidos por monitorar variações no volume de gás e, assim, permite medidas quantitativas de qualquer enzima com atividade oxidativa.

Treinado em química de carboidratos no laboratório do notável Emil Fischer (que recebeu o Prêmio Nobel em Química em 1902), Warburg ganhou o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 1931. Vários dos estudantes e colaboradores de Warburg também foram agraciados com Prêmios Nobel: Otto Meyerhof em 1922, Hans Krebs e Fritz Lipmann em 1953 e Hugo Theorell em 1955. O laboratório de Meyerhof forneceu treinamento para Lipmann e para muitos outros ganhadores do Prêmio Nobel: Severo Ochoa (1959), Andre Lwoff (1965) e George Wald (1967).

A captação da glicose é deficiente no diabetes melito tipo 1



O metabolismo de glicose em mamíferos é limitado pela taxa de captação da glicose pelas células e sua fosforilação pela hexocinase. A captação da glicose do sangue é mediada pela família GLUT de transportadores de glicose (ver Tabela 11-3). Os transportadores nos hepatócitos (GLUT1, GLUT2) e nos neurônios encefálicos (GLUT3) estão sempre presentes nas membranas plasmáticas. Por outro lado, o principal transportador de glicose nas células do músculo esquelético, do músculo cardíaco e do tecido adiposo (GLUT4) está armazenado em pequenas vesículas intracelulares e se desloca para a membrana plasmática apenas em resposta a um sinal de insulina (**Figura 14-10**). Esse mecanismo de sinalização da insulina foi discutido no Capítulo 12 (ver Figura 12-20). Portanto, no músculo esquelético, no coração e no tecido adiposo, a captação e o metabolismo da glicose dependem da liberação normal de insulina pelas células β pancreáticas em resposta à quantidade elevada de glicose no sangue (ver Figura 23-27).

QUADRO 14-1



MEDICINA

A alta taxa da glicólise em tumores sugere alvos para quimioterapia e facilita o diagnóstico

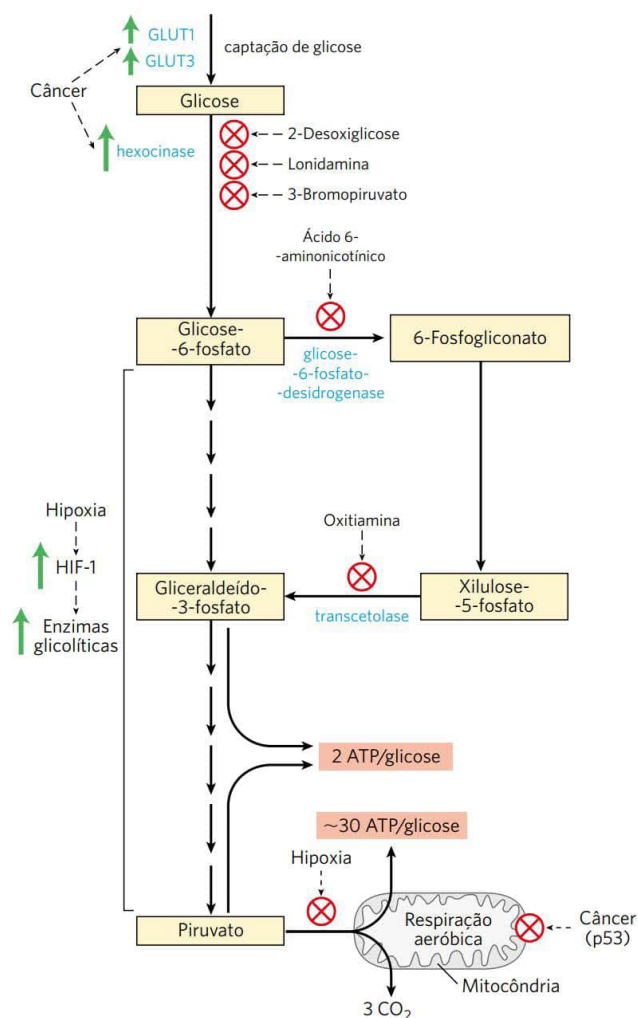
Em muitos tipos de tumores encontrados em seres humanos e em outros animais, a captação e a degradação de glicose ocorrem cerca de 10 vezes mais rápido do que em tecidos normais, não cancerosos. A maior parte das células tumorais cresce em condições de hipoxia (i.e., com suprimento de oxigênio limitado) devido à falta, pelo menos inicialmente, das redes capilares que suprem com oxigênio suficiente. Células cancerosas localizadas a mais de 100 a 200 μm dos capilares mais próximos dependem somente da glicólise (sem oxidação adicional do piruvato) para a maior parte da produção de ATP. O rendimento de energia (2 ATP por glicose) é muito menor do que o que pode ser obtido pela oxidação completa do piruvato a CO_2 na mitocôndria (cerca de 30 ATP por glicose; Capítulo 19). Portanto, para produzir a mesma quantidade de ATP, as células tumorais devem captar muito mais glicose do que as células normais, convertendo-a em piruvato e depois em lactato enquanto reciclam NADH. É provável que as duas etapas iniciais na transformação de uma célula normal em uma célula tumoral sejam (1) a mudança para a dependência da glicólise na produção de ATP e (2) o desenvolvimento de tolerância a pH baixo no líquido extracelular (causado pela liberação do produto final da glicólise, o ácido láctico). Em geral, quanto mais agressivo é o tumor, maior é a taxa de glicólise.

Esse aumento da glicólise é alcançado ao menos em parte pelo aumento da síntese das enzimas glicolíticas e dos transportadores da membrana plasmática GLUT1 e GLUT3 (ver Tabela 11-3) que carregam a glicose para dentro da célula. (Lembre-se de que GLUT1 e GLUT3 não são dependentes de insulina.) O **fator de transcrição induzível por hipoxia (HIF-1, do inglês, hypoxia-inducible transcription factor)** é uma proteína que regula a síntese de mRNA, estimulando a produção de pelo menos oito enzimas glicolíticas e dos transportadores de glicose, quando o suprimento de oxigênio está limitado (Figura Q-1). Com a alta velocidade de glicólise resultante, as células tumorais podem sobreviver em condições anaeróbicas até que o suprimento de vasos sanguíneos alcance o tumor em crescimento. Outra proteína induzida por HIF-1 é o hormônio peptídico fator de crescimento vascular endotelial (VEGF, do inglês, *vascular endothelial growth factor*), que estimula o crescimento dos vasos sanguíneos (angiogênese) em direção do tumor.

FIGURA Q-1 O metabolismo anaeróbico da glicose em células tumorais rende muito menos ATP (2 por glicose) do que a oxidação completa a CO_2 que ocorre em células saudáveis em condições aeróbicas (~ 30 ATP por glicose), de forma que uma célula tumoral deve consumir muito mais glicose para produzir a mesma quantidade de ATP. Os transportadores de glicose e a maior parte das enzimas glicolíticas estão superexpressos em tumores. Os compostos que inibem as enzimas hexocinase, glicose-6-fosfato-desidrogenase ou transcetolase bloqueiam a produção de ATP pela glicólise, privando, assim, a célula cancerosa de energia e matando-a.

Existe também a evidência de que a proteína supressora de tumor p53, mutada na maior parte dos tipos de câncer (ver Seção 12.11), controla a síntese e a montagem das proteínas mitocondriais essenciais para o transporte dos elétrons ao O_2 . As células com p53 mutada são deficientes no transporte de elétrons na mitocôndria e são forçadas a depender mais significativamente da glicólise para a produção de ATP (Figura Q-1).

Essa dependência maior da glicólise, apresentada pelos tumores em comparação aos tecidos normais, sugere uma possibilidade de terapia anticâncer: inibidores da glicólise poderiam atingir e matar tumores por esgotar seu suprimento de ATP. Três inibidores da hexocinase mostram-se promissores como agentes quimioterápicos: 2-desoxiglicose, lonidamina e 3-bromopiruvato. Por impedir a formação de glicose-6-fosfato, esses compostos



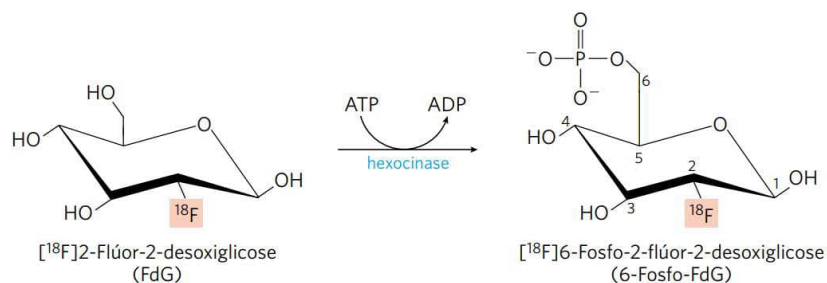


FIGURA Q-2 A fosforilação da 2-flúor-2-desoxiglicose (FdG) marcada com ^{18}F pela hexocinase aprisiona a FdG nas células (como 6-fosfo-FdG), onde sua presença pode ser detectada por emissão de pósitrons pelo ^{18}F .

não apenas privam as células tumorais de ATP glicolicamente produzido, mas também evitam a formação de pentoses-fosfato pela via das pentoses-fosfato, que também inicia com glicose-6-fosfato. Na ausência de pentoses-fosfato, a célula não consegue sintetizar os nucleotídeos essenciais para a síntese de DNA e de RNA, e, assim, não consegue crescer ou se dividir. Outro fármaco anticâncer já aprovado para o uso clínico é o imatinibe (Gleevec), descrito no Quadro 12-4. Ele inibe uma tirosina-cinase específica, impedindo a síntese aumentada da hexocinase, que normalmente é ativada por essa cinase específica. Oxitiamina, um análogo de tiamina que bloqueia a ação de uma enzima tipo transcetolase que converte a xilulose-5-fosfato em gliceraldeído-3-fosfato (Figura Q-1), está em testes pré-clínicos como um fármaco antitumoral.

A alta taxa glicolítica em células tumorais também tem utilidade para diagnósticos. As taxas relativas em

que os tecidos captam glicose podem ser usadas em alguns casos para identificar a localização de tumores. Na tomografia por emissão de pósitrons (TEP), injeta-se nos pacientes um análogo inofensivo da glicose isotopicamente marcado que é captado, mas não metabolizado, pelos tecidos. O composto marcado é a 2-flúor-2-desoxiglicose (FdG), em que o grupo hidroxila no C-2 da glicose é substituído por ^{18}F (Figura Q-2). Esse composto é captado pelos transportadores GLUT, sendo um bom substrato para a hexocinase, mas não pode ser convertido no intermediário enediol na reação da fosfo-hexose-isomerase (ver Figura 14-5) e, consequentemente, se acumula como 6-fosfo-FdG. A extensão do seu acúmulo depende da sua taxa de captação e fosforilação, que, como citado anteriormente, costuma ser 10 ou mais vezes maior em tumores do que em tecidos normais. O decaimento do ^{18}F libera pósitrons (dois por átomo de ^{18}F) que podem ser detectados por uma série de detectores sensíveis localizados ao redor do corpo, o que permite a localização acurada de 6-fosfo-FdG acumulado (Figura Q-3).

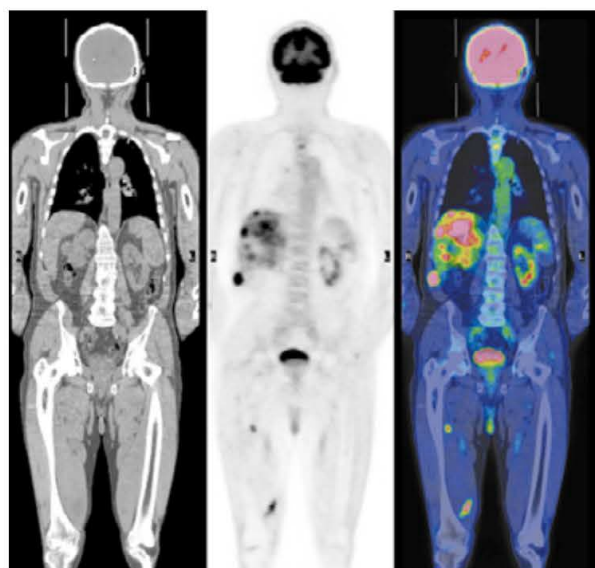


FIGURA Q-3 Detecção de tecidos cancerosos por tomografia por emissão de pósitrons (TEP). O paciente adulto do sexo masculino sofreu remoção cirúrgica de um câncer de pele primário (melanoma maligno). A imagem à esquerda, obtida do corpo todo por tomografia computadorizada (varredura por TC), mostra a localização dos tecidos moles e dos ossos. O painel central é uma varredura por TEP após o paciente ter ingerido 2-flúor-2-desoxiglicose (FdG) marcada com ^{18}F . Os pontos escuros indicam regiões de alta utilização da glicose. Como esperado, o encéfalo e a bexiga estão fortemente marcados – o encéfalo porque utiliza a maior parte da glicose consumida pelo corpo, e a bexiga porque o 6-fosfo-FdG marcado com ^{18}F é excretado na urina. Quando a intensidade da marcação na varredura por TEP é traduzida em cores (a intensidade aumenta de verde para amarelo para vermelho) e a imagem é sobreposta à varredura por TC, a imagem resultante (à direita) revela câncer nos ossos da coluna vertebral superior, no fígado e em algumas regiões musculares, todos resultantes da propagação do melanoma maligno primário. (Fonte: ISM/Phototake.)

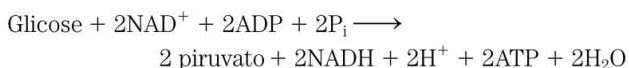
Os indivíduos com diabetes melito tipo 1 (também chamado de diabetes dependente de insulina) têm pouquíssimas células β e são incapazes de liberar insulina suficiente para desencadear a captação de glicose pelas células do músculo esquelético, do coração ou do tecido adiposo. Assim, após uma refeição contendo carboidratos, a glicose acumula-se a níveis anormalmente altos no sangue, condição conhecida como hiperglicemia. Incapazes de captar glicose, o músculo e o tecido adiposo utilizam os ácidos graxos armazenados nos triacilgliceróis como seu principal combustível. No fígado, a acetil-CoA derivada da degradação desses ácidos graxos é convertida nos “corpos cetônicos” – acetoacetato e β -hidroxibutirato –, que são exportados e levados a outros tecidos para serem utilizados como combustível (Capítulo 17). Esses compostos são especialmente cruciais para o encéfalo, que utiliza os corpos cetônicos como combustível alternativo quando a glicose não estiver disponível. (Os ácidos graxos não conseguem atravessar a barreira hematoencefálica e, por isso, não servem de combustível para os neurônios no encéfalo.)

Em pacientes com diabetes melito tipo 1 não tratado, a superprodução de acetoacetato e β -hidroxibutirato leva a seu acúmulo no sangue, e a consequente redução do pH sanguíneo leva à **cetoacidose**, uma condição potencialmente letal. A administração de insulina reverte esta sequência de eventos: o GLUT4 desloca-se para a membrana plasmática dos adipócitos e das células musculares, a glicose é captada e fosforilada por essas células, e o nível de glicose no sangue diminui, reduzindo a produção de corpos cetônicos.

O diabetes melito tem efeitos profundos no metabolismo de carboidratos e lipídeos. Esse tópico será retomado no Capítulo 23, após considerar o metabolismo de lipídeos (Capítulos 17 e 21). ■

RESUMO 14.1 Glicólise

- A glicólise é uma via quase universal pela qual uma molécula de glicose é oxidada a duas moléculas de piruvato, com energia conservada na forma de ATP e NADH.
- As 10 enzimas glicolíticas estão no citosol, e os 10 intermediários são compostos fosforilados de três ou seis carbonos.
- Na fase preparatória da glicólise, ocorre investimento de ATP para a conversão de glicose em frutose-1,6-bisfosfato. A ligação entre C-3 e C-4 é, então, clivada para gerar duas moléculas de triose-fosfato.
- Na fase de pagamento, cada uma das duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato derivadas da glicose sofre oxidação no C-1; a energia dessa reação de oxidação é conservada na forma de um NADH e dois ATP por triose-fosfato oxidada. A equação para o processo global é



- A glicólise é regulada rigidamente de forma coordenada com outras vias geradoras de energia para garantir um suprimento constante de ATP.

- No diabetes tipo 1, a captação deficiente de glicose pelo músculo e pelo tecido adiposo tem efeitos profundos sobre o metabolismo de carboidratos e gorduras.

14.2 Vias alimentadoras da glicólise

Muitos carboidratos, além da glicose, encontram seus destinos catabólicos na glicólise, após serem transformados em um dos intermediários glicolíticos. Os mais significativos são os polissacarídeos de armazenamento, glicogênio e amido, contidos nas células (endógenos) ou obtidos da dieta; os dissacarídeos maltose, lactose, trealose e sacarose; e os monossacarídeos frutose, manose e galactose (**Figura 14-11**).

Os polissacarídeos e os dissacarídeos da dieta sofrem hidrólise a monossacarídeos

Para a maioria dos seres humanos, o amido é a principal fonte de carboidratos na dieta (**Figura 14-11**). A digestão inicia na boca, onde a α -amilase salivar hidrolisa as ligações glicosídicas internas ($\alpha 1 \rightarrow 4$) do amido, produzindo fragmentos polissacarídicos curtos ou oligossacarídeos. (Observe que nessa reação de *hidrólise*, a água, e não P_i , é a espécie atacante.) No estômago, a α -amilase salivar é inativada pelo pH baixo, mas uma segunda forma de α -amilase, secretada pelo pâncreas no intestino delgado, continua o processo de degradação. A α -amilase pancreática gera principalmente maltose e maltotriose (os di e trissacarídeos de glicose) e oligossacarídeos chamados de dextrinas-limite, fragmentos de amilopectina contendo pontos de ramificação ($\alpha 1 \rightarrow 6$). A maltose e as dextrinas são degradadas até glicose por enzimas do epitélio intestinal com borda em escova (as microvilosidades das células epiteliais do intestino, que aumentam muito a superfície intestinal). O glicogênio da dieta tem essencialmente a mesma estrutura do amido, e sua digestão segue a mesma via.

Como visto no Capítulo 7, a maioria dos animais não pode digerir celulose devido à falta da enzima celulase, que cliva as ligações glicosídicas ($\beta 1 \rightarrow 4$) da celulose. Em animais ruminantes, o estômago estendido inclui uma câmara onde microrganismos simbióticos que produzem celulase degradam celulose em moléculas de glicose. Esses microrganismos utilizam a glicose resultante para a fermentação anaeróbica, produzindo grandes quantidades de propionato. Esse propionato serve como material de partida para a gliconeogênese, que gera a maior parte da lactose do leite.

O glicogênio endógeno e o amido são degradados por fosforólise

Os estoques de glicogênio em tecidos animais (principalmente no fígado e no músculo esquelético), em microrganismos ou em tecidos vegetais podem ser mobilizados, para o uso da mesma célula, por uma reação *fosforolítica* catalisada pela **glicogênio-fosforilase** (**amido-fosforilase** em vegetais) (**Figura 14-12**). Essas enzimas catalisam o ataque por P_i sobre a ligação glicosídica ($\alpha 1 \rightarrow 4$) que une os dois últimos resíduos de glicose na extremidade não redutora, gerando glicose-1-fosfato e um polímero com uma unidade de glicose a menos. A *fosforólise* preserva parte da

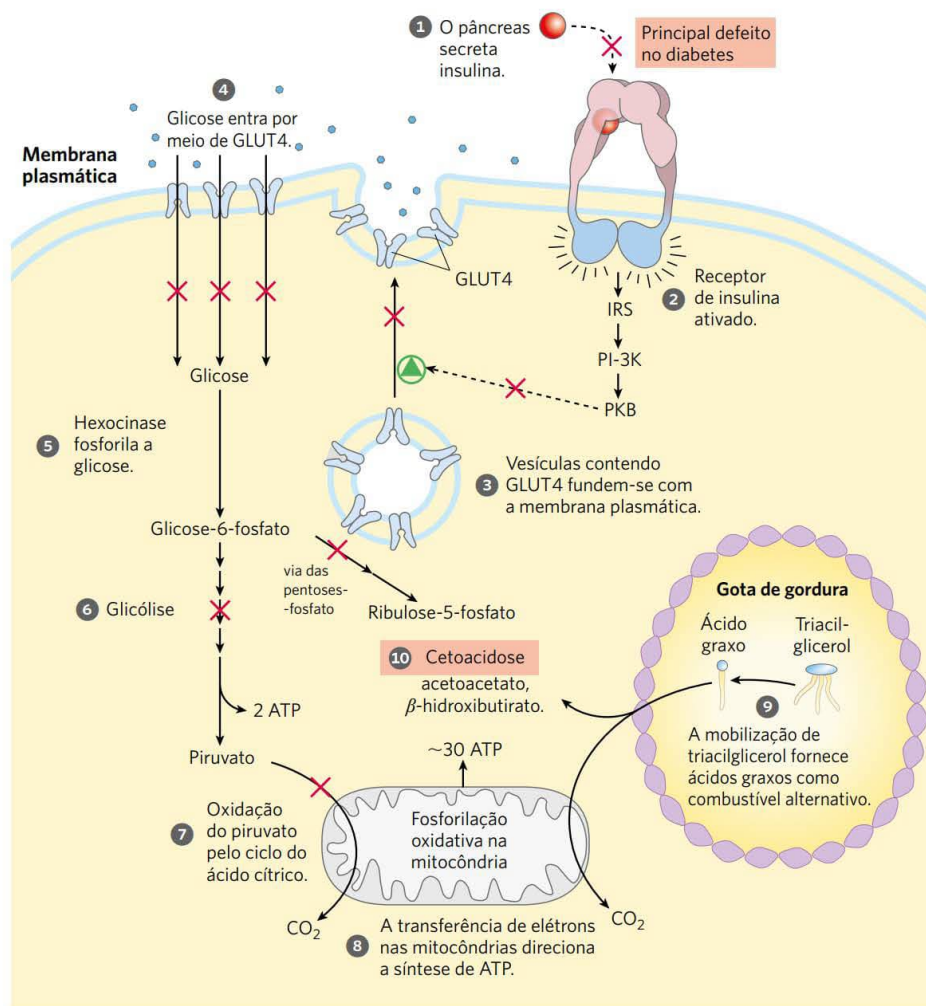


FIGURA 14-10 Efeito do diabetes tipo 1 sobre o metabolismo dos carboidratos e das gorduras em um adipócito. Normalmente, a insulina desencadeia a inserção de transportadores GLUT4 na membrana plasmática pela fusão de vesículas contendo GLUT4 com a membrana, permitindo a captação de glicose do sangue. Quando os níveis de insulina diminuem no sangue, GLUT4 é novamente sequestrado em vesículas por endocitose. No diabetes melito tipo 1 (dependente de insulina), a inserção de GLUT4 nas membranas, assim como outros processos normalmente estimulados por insulina, está inibida, como indicado por X. A deficiência de insulina impede a captação de glicose pelo GLUT4; como consequência, as células são privadas de glicose, embora ela esteja elevada na corrente sanguínea. Sem glicose para o suprimento de energia, os adipócitos degradam triacilgliceróis estocados em gotas de gordura e fornecem os ácidos graxos resultantes para outros tecidos para a produção mitocondrial de ATP. Dois subprodutos da oxidação dos ácidos graxos acumulam-se no fígado (acetoacetato e β -hidroxibutirato, ver p. 668) e são liberados na corrente sanguínea, fornecendo combustível para o encéfalo, mas também diminuindo o pH do sangue, causando cetoacidose. A mesma sequência de eventos ocorre no músculo, exceto que os miócitos não estocam triacilgliceróis, mas captam os ácidos graxos que são liberados na corrente sanguínea pelos adipócitos. (Os detalhes da sinalização da insulina são discutidos na Seção 12.4.)

energia da ligação glicosídica no éster-fosfato da glicose-1-fosfato. A glicogênio-fosforilase (ou amido-fosforilase) age repetidamente até alcançar um ponto próximo à ramificação ($\alpha 1 \rightarrow 6$) (ver Figura 7-13), onde cessa sua ação. Uma **enzima de desramificação** remove as ramificações. Os mecanismos e o controle da degradação do glicogênio estão descritos mais detalhadamente no Capítulo 15.

A glicose-1-fosfato produzida pela glicogênio-fosforilase é convertida em glicose-6-fosfato pela **fosfoglicomutase**, que catalisa a reação reversível:



A fosfoglicomutase utiliza basicamente o mesmo mecanismo que a fosfoglicerato-mutase (Figura 14-9): ambas envolvem um intermediário bifosfato, e a enzima é transitoriamente fosforilada em cada ciclo catalítico. O nome geral **mutase** é dado a enzimas que catalisam a transferência de um grupo funcional de uma posição para outra na mesma molécula. As mutases são uma subclasse das **isomerases**, enzimas que interconvertem estereoisômeros ou isômeros estruturais ou de posição (ver Tabela 6-3). A glicose-6-fosfato formada na rea-

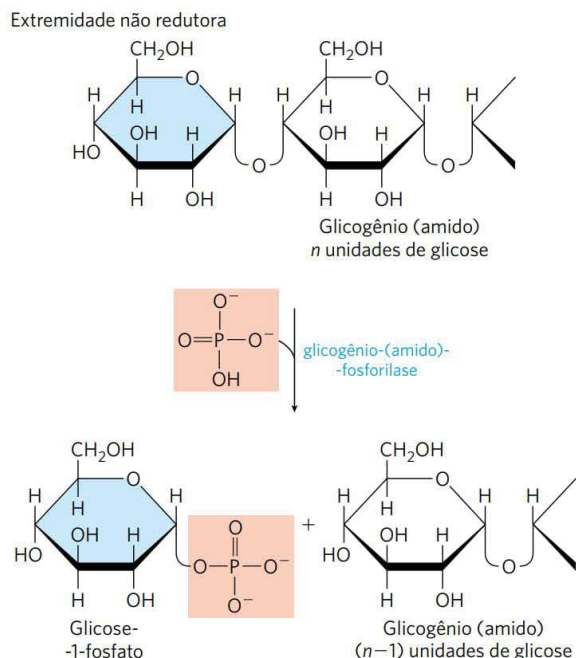



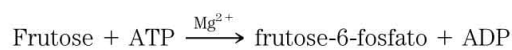
FIGURA 14-12 Degradação do glicogênio intracelular pela glicogênio-fosforilase. A enzima catalisa o ataque pelo fosfato inorgânico (em cor salmão) sobre o resíduo glicosila terminal (em azul) na extremidade não redutora de uma molécula de glicogênio, liberando glicose-1-fosfato e formando uma molécula de glicogênio com um resíduo de glicose a menos. A reação é uma *fosforólise* (e não uma hidrólise).

 A **intolerância à lactose**, comum entre adultos na maior parte das populações humanas, exceto aquelas originárias do norte da Europa e alguns países da África, é devida ao desaparecimento, após a infância, da maior parte ou de toda atividade lactásica das células epiteliais intestinais. Na ausência de lactase intestinal, a lactose não pode ser completamente digerida e absorvida no intestino delgado, passando para o intestino grosso, onde bactérias a convertem em produtos tóxicos que causam câibras abdominais e diarreia. O problema é ainda mais complicado porque a lactose não digerida e seus metabólitos aumentam a osmolaridade do conteúdo intestinal, favorecendo a retenção de água no intestino. Na maioria dos lugares do mundo onde a intolerância à lactose é prevalente, o leite não é usado como alimento para adultos, embora os produtos do leite pré-digeridos com lactase estejam comercialmente disponíveis em alguns países. Em certas patologias humanas, estão ausentes algumas ou todas as dissacaridases intestinais. Nesses casos, o distúrbio digestivo ocasionado pelos dissacarídeos da dieta pode ser minimizado por uma dieta controlada. ■

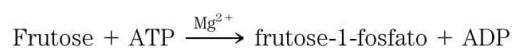
Outras hexoses podem entrar na via glicolítica em distintos pontos

Na maioria dos organismos, outras hexoses, além da glicose, podem sofrer glicólise após conversão em um derivado fos-

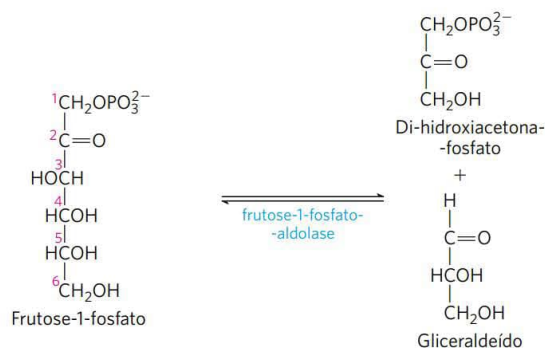
forilado. A D-frutose, presente em sua forma livre em muitas frutas e formada por hidrólise da sacarose no intestino delgado dos vertebrados, é fosforilada pela hexocinase:



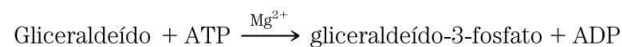
Esta é a principal via de entrada da frutose na glicólise nos músculos e nos rins. No fígado, a frutose entra por uma via diferente. A enzima hepática **frutocinase** catalisa a fosforilação da frutose no C-1, em vez do C-6:




A frutose-1-fosfato é, então, clivada a gliceraldeído e di-hidroxiacetona-fosfato pela **frutose-1-fosfato-aldolase**:

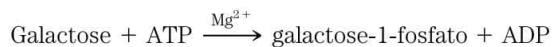


A di-hidroxiacetona-fosfato é convertida em gliceraldeído-3-fosfato pela enzima glicolítica triose-fosfato-isomerase. O gliceraldeído é fosforilado pelo ATP e pela **triose-cinase** a gliceraldeído-3-fosfato:



Assim, os dois produtos da hidrólise da frutose-1-fosfato entram na via glicolítica como gliceraldeído-3-fosfato.

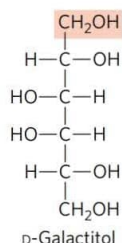
 A D-galactose, produto da hidrólise da lactose (açúcar do leite), passa pela corrente sanguínea do intestino para o fígado, onde é primeiro fosforilada no C-1, à custa de ATP, pela enzima **galactocinase**:



A galactose-1-fosfato é, então, convertida em seu epímero no C-4, a glicose-1-fosfato, por um conjunto de reações nas quais o **difosfato de uridina** (UDP) funciona como um transportador, semelhante a uma coenzima, de grupos hexose (**Figura 14-13**). A epimerização envolve primeiro a oxidação do grupo —OH no C-4 para uma cetona, em seguida a redução da cetona para um —OH, com inversão da configuração no C-4. NAD é o cofator tanto para a oxidação como para a redução.

A deficiência de qualquer uma das três enzimas dessa via causa **galactosemia** em seres humanos. Na galactosemia por deficiência de galactocinase, altas concentrações de galactose são encontradas no sangue e na urina. Os indivíduos afetados desenvolvem catarata durante a infância,

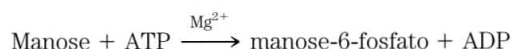
causada pela deposição no cristalino de um metabólito da galactose, o galactitol.



Os outros sintomas dessa patologia são relativamente leves, e a limitação rigorosa de galactose na dieta diminui de modo significativo sua gravidade.

A galactosemia por deficiência da transferase é mais séria; ela é caracterizada por retardo do crescimento na infância, anormalidade na fala, deficiência intelectual e dano hepático que pode ser fatal, mesmo quando a galactose é retirada da dieta. A galactosemia por deficiência da epimerase leva a sintomas similares, porém é menos grave quando a galactose da dieta é cuidadosamente controlada. ■

A D-manose, liberada na ingestão de vários polissacarídeos e glicoproteínas dos alimentos, pode ser fosforilada no C-6 pela hexocinase:



A manose-6-fosfato é isomerizada pela **fosfomanose-isomerase**, gerando frutose-6-fosfato, intermediário da glicólise.

RESUMO 14.2 Vias alimentadoras da glicólise

- O glicogênio e o amido endógenos, as formas de armazenamento da glicose, entram na glicólise em um processo de duas etapas. A clivagem por fosforólise de um resíduo de glicose de uma extremidade do polímero, formando glicose-1-fosfato, é catalisada pela glicogênio-fosforilase ou pela amido-fosforilase. A fosfoglicomutase, então, converte a glicose-1-fosfato em glicose-6-fosfato, que pode entrar na glicólise.
- Os polissacarídeos e os dissacarídeos ingeridos são convertidos em monossacarídeos por enzimas hidrolíticas intestinais, e os monossacarídeos, então, entram nas células intestinais e são transportados para o fígado ou para outros tecidos.
- Várias D-hexoses, incluindo a frutose, a galactose e a manose, podem entrar na glicólise. Cada uma delas é fosforilada e convertida em glicose-6-fosfato, frutose-6-fosfato ou frutose-1-fosfato.
- A conversão de galactose-1-fosfato em glicose-1-fosfato envolve dois derivados nucleotídicos: UDP-galactose e UDP-glicose. Defeitos genéticos em qualquer das três enzimas que catalisam a conversão de galactose em glicose-1-fosfato resultam em galactosemias de gravidade variada.

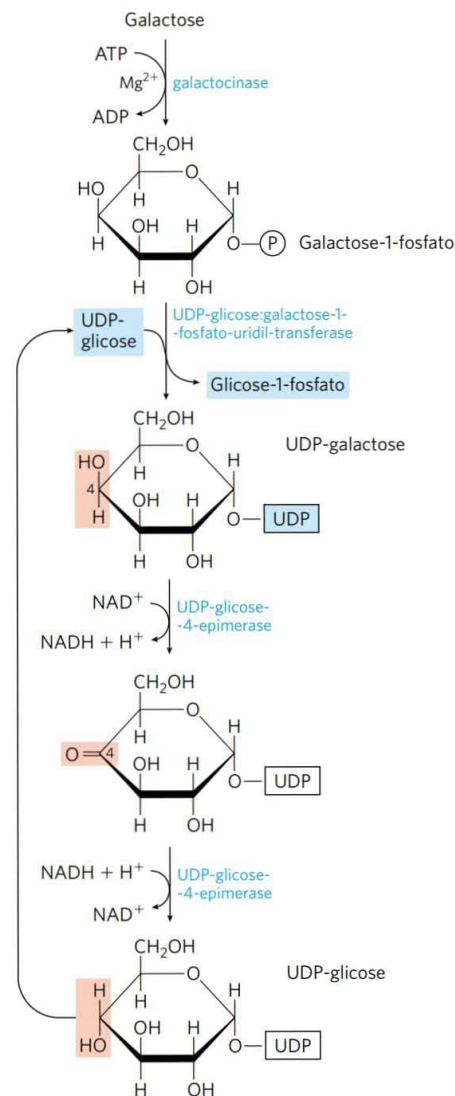


FIGURA 14-13 Conversão da galactose em glicose-1-fosfato. A conversão ocorre por meio de um derivado açúcar-nucleotídeo, a UDP-galactose, que é formado quando a galactose-1-fosfato desloca a glicose-1-fosfato da UDP-glicose. A UDP-galactose é, então, convertida pela UDP-glicose-4-epimerase a UDP-glicose, em uma reação que envolve a oxidação do C-4 (em cor salmão) pelo NAD^+ , e então a redução do C-4 por NADH ; o resultado é a inversão da configuração em C-4. A UDP-glicose é regenerada por meio de um novo ciclo das mesmas reações. O efeito líquido desse ciclo é a conversão de galactose-1-fosfato em glicose-1-fosfato; não há produção ou consumo líquido de UDP-galactose ou UDP-glicose.

14.3 Destinos do piruvato em condições anaeróbicas: fermentação

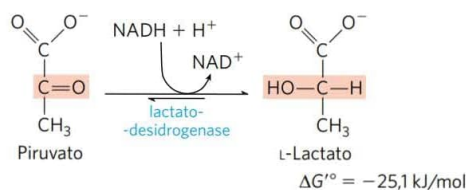
Em condições aeróbicas, o piruvato formado na etapa final da glicólise é oxidado a acetato (acetil-CoA), que entra no ciclo do ácido cítrico e é oxidado a CO_2 e H_2O . O NADH formado pela desidrogenação do gliceraldeído-3-fosfato é

finalmente reoxidado a NAD^+ pela transferência de seus elétrons ao O_2 na respiração mitocondrial. No entanto, em condições de hipoxia (pouco oxigênio) – assim como no músculo esquelético muito ativo, nos tecidos vegetais submersos, nos tumores sólidos ou nas bactérias lácticas –, o NADH gerado pela glicólise não pode ser reoxidado pelo O_2 . A falha na regeneração de NAD^+ deixaria a célula carente deceptor de elétrons para a oxidação de gliceraldeído-3-fosfato, e as reações geradoras de energia da glicólise cessariam. Portanto, o NAD^+ deve ser regenerado de outra forma.

As células primitivas que viviam em uma atmosfera praticamente desprovida de oxigênio tiveram que desenvolver estratégias para extrair energia de moléculas combustíveis em condições anaeróbicas. A maioria dos organismos modernos reteve a capacidade de regenerar NAD^+ continuamente durante a glicólise anaeróbica pela transferência de elétrons do NADH para formar um produto final reduzido, como lactato ou etanol.

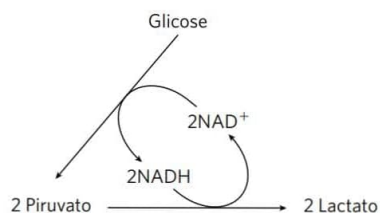
O piruvato é o aceptor final de elétrons na fermentação láctica

Quando tecidos animais não podem ser supridos com oxigênio suficiente para realizar a oxidação aeróbica do piruvato e do NADH produzidos na glicólise, o NAD^+ é regenerado a partir do NADH pela redução do piruvato a **lactato**. Como mencionado, alguns tecidos e tipos celulares (como os eritrócitos, que não possuem mitocôndria e, portanto, não podem oxidar piruvato até CO_2) produzem lactato a partir de glicose mesmo em condições aeróbicas. A redução do piruvato por essa via é catalisada pela **lactato-desidrogenase**, que forma o isômero L do lactato em pH 7:



O equilíbrio global da reação favorece bastante a formação de lactato, como mostrado pela grande variação negativa da energia livre padrão.

Na glicólise, a desidrogenação de duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato produzidas a partir de cada molécula de glicose converte duas moléculas de NAD^+ em duas de NADH. Como a redução de duas moléculas de piruvato em duas de lactato regenera duas moléculas de NAD^+ , não ocorre variação líquida de NAD^+ ou NADH:

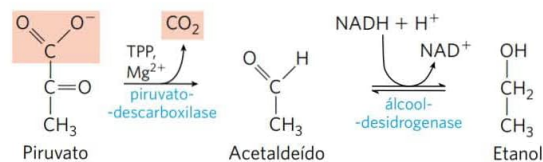


O lactato formado pelo músculo esquelético em atividade (ou pelos eritrócitos) pode ser reciclado; ele é transportado pelo sangue até o fígado, onde é convertido em glicose durante a recuperação da atividade muscular exaustiva. Quando o lactato é produzido em grande quantidade durante a contração muscular vigorosa (p. ex., durante uma corrida de velocidade), a acidificação resultante da ionização do ácido láctico nos músculos e no sangue limita o período de atividade vigorosa. Os atletas mais bem condicionados só podem correr por um minuto em velocidade máxima (Quadro 14-2).

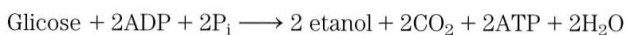
Embora a conversão de glicose em lactato compreenda duas etapas de oxidação-redução, não ocorre variação líquida no estado de oxidação do carbono; na glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) e no ácido láctico ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$), a relação H:C é a mesma. Todavia, parte da energia da molécula da glicose é extraída pela sua conversão em lactato – o suficiente para dar um rendimento líquido de duas moléculas de ATP para cada molécula de glicose consumida. **Fermentação** é o termo geral para esse processo, que extrai energia (como ATP), mas não consome oxigênio nem causa variação nas concentrações de NAD^+ ou NADH. As fermentações são realizadas por uma grande variedade de organismos, muitos deles ocupando nichos anaeróbicos e produzindo diversos produtos finais, alguns para uso comercial.

O etanol é o produto reduzido na fermentação alcoólica

Leveduras e outros microrganismos fermentam glicose em etanol e CO_2 , em vez de lactato. A glicose é convertida a piruvato pela glicólise, e o piruvato é convertido a etanol e CO_2 em um processo de duas etapas:



Na primeira etapa, o piruvato é descarboxilado em uma reação irreversível catalisada pela **piruvato-decarboxilase**. Essa reação é uma descarboxilação simples e não envolve a oxidação do piruvato. A piruvato-decarboxilase requer Mg^{2+} e contém uma coenzima fortemente ligada, a tiamina-pirofosfato, discutida a seguir. Na segunda etapa, o acetaldeído é reduzido a etanol pela ação da **álcool-desidrogenase**, com o poder redutor fornecido pelo NADH derivado da desidrogenação do gliceraldeído-3-fosfato. Essa reação é um caso bem estudado de transferência de grupo hidreto do NADH (**Figura 14-14**). Etanol e CO_2 são, então, os produtos finais da fermentação alcoólica, e a equação geral é:



Como na fermentação láctica, não existe variação líquida na razão entre átomos de hidrogênio e carbono quando a glicose (razão H:C = 12/6 = 2) é fermentada a duas moléculas de etanol e duas de CO_2 (razão H:C combinada = 12/6 = 2). Em todas as fermentações, a razão H:C dos reagentes e dos produtos permanece a mesma.

QUADRO 14-2 Atletas, jacarés e celacantos: glicólise em concentrações limitantes de oxigênio

Os vertebrados são em sua maior parte organismos essencialmente aeróbicos: eles convertem glicose em piruvato pela glicólise, depois utilizam o oxigênio molecular para oxidar completamente o piruvato a CO_2 e H_2O . O catabolismo anaeróbico da glicose a lactato ocorre durante curtos pulsos de atividade muscular extrema, por exemplo, em uma corrida de 100 m, durante a qual o oxigênio não pode ser transportado para os músculos com a rapidez suficiente para oxidar o piruvato. Assim, os músculos utilizam seus estoques de glicose (glicogênio) como combustível para gerar ATP por fermentação, com lactato como produto final. Em uma corrida de 100 m em alta velocidade, a concentração de lactato no sangue aumenta muito. No fígado, ele é lentamente convertido em glicose pela gliconeogênese no período de descanso ou recuperação, quando, então, o oxigênio é consumido em taxas gradualmente menores até a velocidade da respiração retornar ao normal. O excesso de oxigênio consumido no período de recuperação representa a reposição do débito de oxigênio. Essa é a quantidade de oxigênio necessária para suprir ATP para a gliconeogênese durante a recuperação, para regenerar o glicogênio “tomado emprestado” do fígado e do músculo para realizar atividade muscular intensa na corrida de velocidade. O ciclo de reações que incluem a conversão de glicose em lactato no músculo e a conversão de lactato em glicose no fígado é chamado de ciclo de Cori, em homenagem a Carl e Gerty Cori, cujos estudos, nas décadas de 1930 e 1940, elucidaram a via e seu papel (ver Quadro 15-4).

O sistema circulatório da maioria dos vertebrados de pequeno porte consegue transportar oxigênio para os músculos com velocidade suficiente para evitar o uso anaeróbico de glicogênio muscular. Por exemplo, os pássaros migrantes com frequência voam grandes distâncias em alta velocidade sem descansar e sem incorrer em débito de oxigênio. Muitos animais velozes de porte moderado também mantêm um metabolismo essencialmente aeróbico em seus músculos esqueléticos. No entanto, o sistema circulatório de animais de grande porte, incluindo o ser humano, não consegue sustentar o metabolismo aeróbico nos músculos esqueléticos por longos períodos de atividade muscular intensa. Esses animais, em geral, movem-se lentamente em circunstâncias normais e desenvolvem atividade muscular intensa apenas em emergências muito graves, já que tal pulso de atividade requer um longo período de recuperação para repor o débito de oxigênio.

Os jacarés e os crocodilos, por exemplo, são normalmente animais lentos. No entanto, quando provocados, eles podem atacar com grande velocidade e podem dar chicotadas violentas com suas caudas poderosas. Esses pulsos de atividade intensa são curtos e devem ser seguidos por longos períodos de recuperação. Os movimentos rápidos de emergência requerem fermentação láctica para gerar ATP nos músculos esqueléticos. Os estoques musculares de glicogênio são rapidamente consumidos

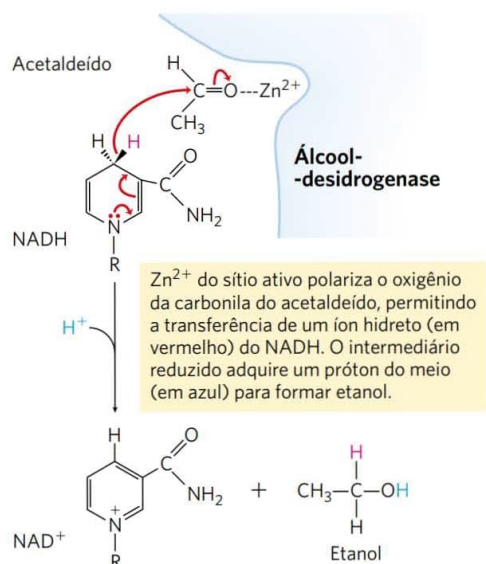
na atividade muscular intensa, e o lactato atinge concentrações muito altas em miócitos e no líquido extracelular. Enquanto um atleta treinado pode se recuperar de uma corrida de 100 m em 30 minutos ou menos, um jacaré pode precisar de muitas horas de descanso e de consumo extra de oxigênio para remover o excesso de lactato de seu sangue e regenerar o glicogênio muscular após um pulso de atividade.

Outros animais de grande porte, como os elefantes e os rinocerontes, têm características metabólicas semelhantes às dos mamíferos aquáticos, como as baleias e as focas. Os dinossauros e outros animais de porte enorme, agora extintos, provavelmente dependiam da fermentação láctica para fornecer energia para a atividade muscular, seguida de períodos muito longos de recuperação em que ficavam vulneráveis ao ataque por predadores menores, mais capazes de utilizar oxigênio e, assim, mais bem adaptados para atividades musculares contínuas e sustentadas.

Explorações do alto-mar revelaram muitas espécies de vida marinha em grandes profundidades oceânicas, onde a concentração de oxigênio é quase zero. Por exemplo, o celacanto primitivo, peixe grande encontrado em profundidades de 4.000 m ou mais na costa da África do Sul, tem metabolismo essencialmente anaeróbico em quase todos os tecidos. Ele converte carboidratos em lactato e em outros produtos, sendo que a maior parte deles deve ser excretada. Alguns vertebrados marinhos fermentam glicose a etanol e CO_2 para gerar ATP.



[Fonte: John Zocco/Shutterstock.]



MECANISMO-FIGURA 14-14 A reação da álcool-desidrogenase.

A piruvato-descarboxilase está presente na levedura utilizada para fabricação de cerveja e pão (*Saccharomyces cerevisiae*) e em todos os organismos que fermentam glicose em etanol, incluindo algumas plantas. O CO_2 produzido pela piruvato-descarboxilase na levedura da cerveja é responsável pela efervescência característica do champanhe. A antiga arte de fazer cerveja envolve vários processos enzimáticos além das reações da fermentação alcoólica (Quadro 14-3). Na panificação, o CO_2 liberado pela piruvato-descarboxilase quando a levedura é misturada com o açúcar fermentável faz a massa crescer. A enzima está ausente em tecidos de vertebrados e em outros organismos que realizam fermentação láctica.

A álcool-desidrogenase está presente em muitos organismos que metabolizam etanol, incluindo o ser humano. No fígado, ela catalisa a oxidação do etanol ingerido ou produzido por microrganismos intestinais, com a concomitante redução de NAD^+ a NADH. Nesse caso, a reação segue no sentido oposto àquele envolvido na produção de etanol pela fermentação.

A tiamina-pirofosfato transporta grupos “acetaldeído ativos”



A reação da piruvato-descarboxilase proporciona nosso primeiro encontro com a **tiamina-pirofosfato (TPP)** (Figura 14-15), uma coenzima derivada da vitamina B_1 . A deficiência de vitamina B_1 na dieta humana leva a uma patologia conhecida como beribéri, caracterizada pelo acúmulo de fluidos corporais (inchaço), dor, paralisia e, em última instância, morte. ■

A tiamina-pirofosfato exerce um papel importante na clivagem de ligações adjacentes ao grupo carbonila, como a descarboxilação de α -cetoácidos, e em rearranjos químicos em que um grupo acetaldeído ativado é transferido de um átomo de carbono para outro (Tabela 14-1). A porção

funcional da TPP, o anel tiazólico, contém um próton relativamente ácido em C-2. A perda desse próton produz um carbânion, que é a espécie ativa nas reações dependentes de TPP (Figura 14-15).

O carbânion liga-se prontamente ao grupo carbonila, e o anel tiazólico está, consequentemente, posicionado para atuar como “escoadouro de elétrons”, o que facilita significativamente as reações, como a descarboxilação catalisada pela piruvato-descarboxilase.

As fermentações são usadas para produzir alguns alimentos comuns e reagentes químicos industriais

Há milênios a humanidade aprendeu a usar a fermentação na produção e na conservação de alimentos. Certos microrganismos presentes em alimentos naturais fermentam os carboidratos e geram produtos metabólicos que dão aos alimentos sua forma, textura e sabor característicos. Os iogurtes, já conhecidos no período bíblico, são produzidos quando a bactéria *Lactobacillus bulgaricus* fermenta os carboidratos do leite, produzindo ácido láctico; a diminuição do pH resultante desse processo causa a precipitação das proteínas do leite, produzindo a textura espessa e o sabor ácido do iogurte não adoçado. Outra bactéria, a *Propionibacterium freudenreichii*, fermenta o leite, produzindo ácido propiônico e CO_2 ; o ácido propiônico precipita as proteínas do leite, e as bolhas de CO_2 formam os furos característicos do queijo suíço. Muitos outros produtos alimentares são resultantes de fermentações: pickles, chucrute, salsicha, molho de soja e uma variedade de pratos típicos, como kimchi (Coreia), tempoyak (Indonésia), kefir (Rússia), dahi (Índia) e pozol (México). A redução do pH associada à fermentação também ajuda a preservar os alimentos, já que a maioria dos microrganismos que causam a deterioração dos alimentos não cresce em pH baixo. Na agricultura, subprodutos vegetais, como os colmos de milho, são mantidos para o uso na alimentação de animais, sendo armazenados em grandes silos com acesso de ar limitado; a fermentação microbiana produz ácidos que diminuem o pH. A silagem resultante desse processo de fermentação pode ser utilizada como alimento animal por longos períodos sem estragar.

Em 1910, Chaim Weizmann (posteriormente o primeiro presidente de Israel) descobriu que a bactéria *Clostridium acetobutyricum* fermenta amido em butanol e acetona. Essa descoberta abriu o campo das fermentações industriais, em que alguns materiais facilmente disponíveis, ricos em carboidratos (p. ex., amido de milho, ou melaço), são fornecidos a uma cultura pura de microrganismos específicos, que os fermenta a um produto de valor comercial maior. O etanol usado para fazer *gasohol* (mistura de 10% de etanol e 90% de gasolina) é produzido por fermentação microbiológica, assim como os ácidos fórmico, acético, propiônico, butírico e succínico e os álcoois glicerol, metanol, isopropanol, butanol e butanediol. Em geral, essas fermentações são desenvolvidas em grandes tanques fechados em que a temperatura e o acesso de ar são controlados para favorecer a multiplicação dos organismos desejados e excluir organismos contaminantes. A beleza das fermentações industriais está no fato de que as transformações químicas

QUADRO 14-3 Fermentação alcoólica: fabricando cerveja e produzindo biocombustíveis

A produção de cerveja foi uma ciência aprendida cedo na história da humanidade, sendo mais tarde aprimorada para a produção em larga escala. Os cervejeiros fabricam a cerveja por meio da fermentação alcoólica de carboidratos presentes em grãos de cereais (sementes), como a cevada, realizada pelas enzimas glicolíticas das leveduras. Os carboidratos, constituídos principalmente de polissacarídeos, devem ser primeiro degradados a dissacarídeos e monossacarídeos. No processo chamado de maltagem, as sementes da cevada germinam até formarem as enzimas hidrolíticas necessárias para a quebra dos polissacarídeos. Nesse ponto, a germinação é interrompida por aquecimento controlado. O produto é o malte, o qual contém enzimas que catalisam a hidrólise das ligações β da celulose e de outros polissacarídeos da parede celular da casca da cevada e enzimas como a α -amilase e a maltase.

Em seguida, o cervejeiro prepara o mosto, o meio nutriente necessário para a fermentação pelas células das leveduras. O malte é misturado com água, sendo, então, macerado. Isso permite que as enzimas formadas no processo de maltagem hidrolisem os polissacarídeos dos cereais para formar maltose, glicose e outros açúcares simples, solúveis em meio aquoso. O material celular restante é separado, e o mosto líquido é fervido com lúpulo para dar o sabor. O mosto é resfriado e, então, aerado.

Agora, são adicionadas células de levedura. No mosto aeróbico, as leveduras crescem e se reproduzem muito rapidamente, usando a energia obtida dos açúcares disponíveis. Não é formado etanol durante esse estágio, porque as leveduras, amplamente supridas com oxigênio, oxidam o piruvato formado pela glicólise em CO_2 e H_2O por meio do ciclo do ácido cítrico. Quando todo o oxigênio dissolvido existente no tanque de fermentação do mosto tiver sido consumido, as leveduras mudam para o metabolismo anaeróbico, e, a partir desse ponto, elas fermentam os açúcares em etanol e CO_2 . O processo de fermentação é controlado em parte pela concentração de etanol formado, pelo pH e pela quantidade remanescente de açúcar. Após a fermentação ter sido interrompida, as células são removidas, e a cerveja “crua” está pronta para o processamento final.

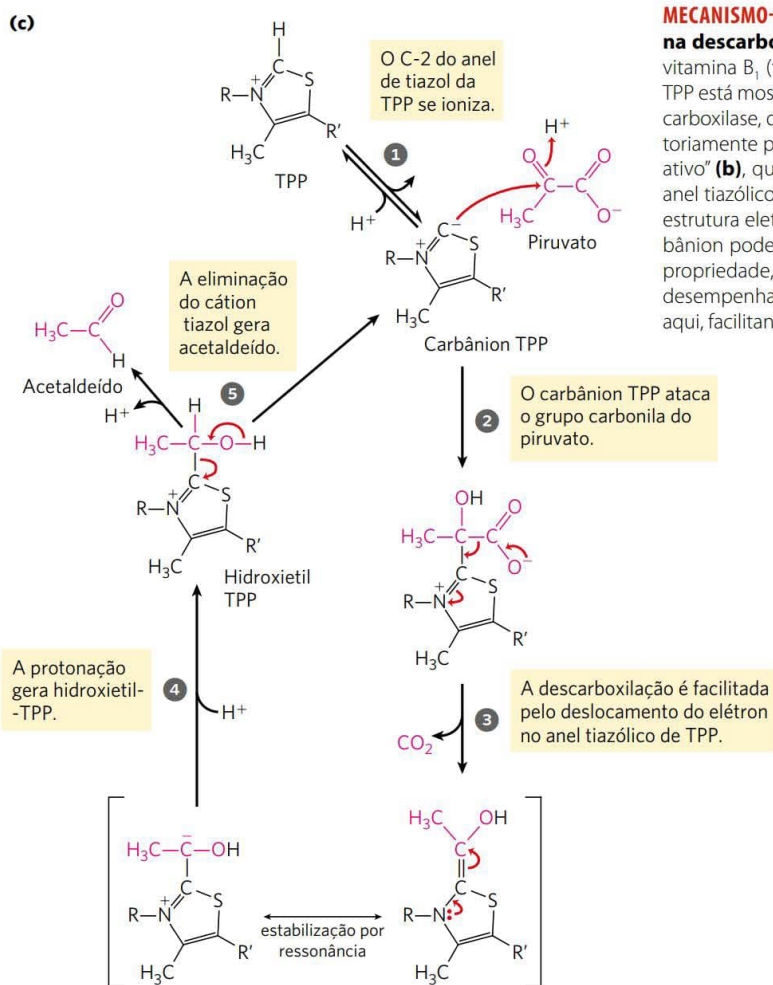
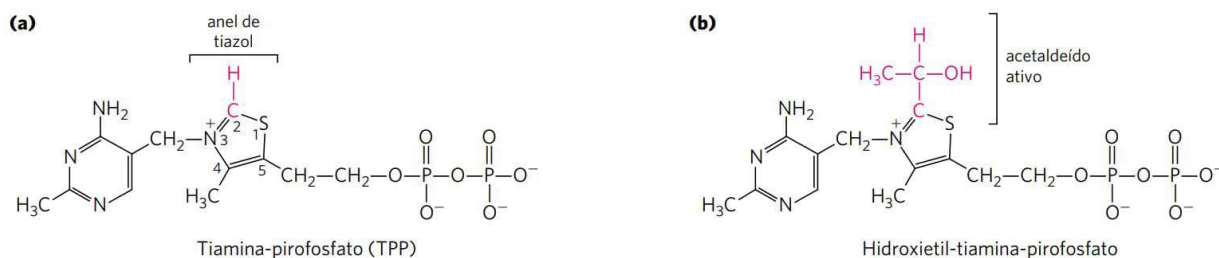
Nas etapas finais da fabricação da cerveja, é ajustada a quantidade de espuma (ou colarinho), resultante de proteínas dissolvidas. Em geral, isso é controlado por enzimas proteolíticas que surgem do processo de maltagem. Caso essas enzimas atuem sobre as proteínas por

longo período de tempo, a cerveja terá colarinho muito pequeno e ficará “choca”; se elas não agirem por um tempo suficiente, a cerveja ficará turva quando gelada. Algumas vezes, enzimas proteolíticas de outras fontes são adicionadas para controlar a espuma.

Grande parte da tecnologia desenvolvida para a produção de bebidas alcoólicas em larga escala encontra aplicação em um problema inteiramente diferente: a produção de etanol como combustível renovável. Com a redução contínua dos estoques conhecidos de combustíveis fósseis e o aumento da demanda por combustível para motores de combustão interna, cresce o interesse no uso de etanol como um combustível substituto ou um complemento. A principal vantagem do etanol como combustível é que ele pode ser produzido a partir de fontes relativamente *baratas e renováveis*, ricas em sacarose, amido ou celulose – amido de milho ou trigo, sacarose de beterraba ou cana e celulose de palha, de resíduos de indústrias florestais ou de resíduos sólidos domésticos. Geralmente, a matéria-prima é convertida quimicamente primeiro em monossacarídeos, depois é fornecida como alimento a uma linhagem robusta de levedura em um fermentador em escala industrial (Figura Q-1). A fermentação pode render não apenas etanol para combustível, mas também subprodutos, como proteínas, que podem ser usadas para alimentação de animais.



FIGURA Q-1 Fermentações em escala industrial para a produção de biocombustível e outros produtos são realizadas em tanques que comportam milhares de litros de meio. [Fonte: Charles O'Rear/Corbis.]



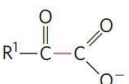
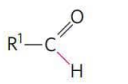
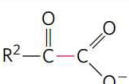
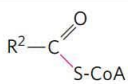
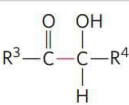
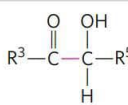
MECANISMO-FIGURA 14-15 Tiamina-pirofosfato (TPP) e seu papel na descarboxilação do piruvato.

(a) TPP é a forma de coenzima da vitamina B₁ (tiamina). O átomo de carbono reativo no anel de tiazol da TPP está mostrado em vermelho. Na reação catalisada pela piruvato-des-carboxilase, dois dos três carbonos do piruvato são transportados transitoriamente pela TPP na forma de um grupo hidroxi-etila, ou “acetaldeído ativo” (b), que é subsequentemente liberado como acetaldeído. (c) O anel tiazólico da TPP estabiliza intermediários carbânion provendo uma estrutura eletrofílica (deficiente em elétrons) em que os elétrons do carbânion podem ser deslocados por ressonância. As estruturas com essa propriedade, frequentemente chamadas de “escoadours de elétrons”, desempenham um papel importante em muitas reações bioquímicas – aqui, facilitando a clivagem da reação carbono-carbono.

complexas e de múltiplas etapas são realizadas com grande rendimento e com poucos subprodutos por fábricas químicas que se autorreproduzem – as células microbianas. Para algumas fermentações industriais, foi desenvolvida uma tec-

nologia de imobilização das células em um suporte inerte, de modo a passar a matéria-prima continuamente pelo leito de células imobilizadas e coletar o produto desejado no efluente – um sonho dos engenheiros!

TABELA 14-1 Algumas reações dependentes de TPP

Enzima	Via(s)	Ligação clivada	Ligação formada
Piruvato-descarboxilase	Fermentação alcoólica		
Piruvato-desidrogenase α -Cetoglutarato-desidrogenase	Síntese de acetil-CoA Ciclo do ácido cítrico		
Transcetolase	Reações de fixação de carbono Via das pentoses-fosfato		

RESUMO 14.3 Destinos do piruvato em condições anaeróbicas: fermentação

- O NADH formado na glicólise deve ser reciclado para regenerar NAD^+ , necessário como aceptor de elétrons na primeira etapa da fase de pagamento. Em condições aeróbicas, os elétrons passam do NADH para o O_2 na respiração mitocondrial.
- Em condições anaeróbicas ou de hipoxia, muitos organismos regeneram NAD^+ pelo transporte de elétrons do NADH para o piruvato, formando lactato. Outros organismos, como as leveduras, regeneram NAD^+ pela redução de piruvato em etanol e CO_2 . Nesses processos anaeróbicos (fermentações), não ocorre oxidação ou redução líquida dos carbonos da glicose.
- Uma grande variedade de microrganismos pode fermentar o açúcar de alimentos frescos, resultando em mudanças de pH, sabor e textura, protegendo os alimentos da deterioração. As fermentações são usadas na indústria para produzir uma ampla variedade de compostos orgânicos comercialmente valiosos a partir de matérias-primas baratas.

14.4 Gliconeogênese

O papel central da glicose no metabolismo surgiu cedo na evolução, e esse açúcar permanece sendo combustível quase universal e unidade estrutural nos organismos atuais, desde micróbios até seres humanos. Em mamíferos, alguns tecidos dependem quase completamente de glicose para sua energia metabólica. Para o encéfalo humano e o restante do sistema nervoso, assim como para os eritrócitos, os testículos, a medula renal e os tecidos embrionários, a glicose do sangue é a principal ou a única fonte de combustível. Apenas o encéfalo requer em média 120 g de glicose por dia – mais da metade de toda a glicose estocada como glicogênio nos músculos e no fígado. No entanto, o suprimento de glicose a partir desses estoques não é sempre suficiente; entre as refeições e durante períodos de jejum mais

longos, ou após exercício vigoroso, o glicogênio esgota-se. Para esses períodos, os organismos precisam de um método para sintetizar glicose a partir de precursores que não são carboidratos. Isso é realizado por uma via chamada de **gliconeogênese** (“nova formação de açúcar”), que converte em glicose o piruvato e compostos relacionados, com três e quatro carbonos.

A gliconeogênese ocorre em todos os animais, vegetais, fungos e microrganismos. As reações são essencialmente as mesmas em todos os tecidos e em todas as espécies. Os precursores importantes da glicose em animais são compostos de três carbonos, como o lactato, o piruvato e o glicerol, assim como certos aminoácidos (**Figura 14-16**). Em mamíferos, a gliconeogênese ocorre principalmente no fígado, e em menor extensão no córtex renal e nas células epiteliais que revestem internamente o intestino delgado. A glicose assim produzida passa para o sangue e supre outros tecidos. Após exercícios vigorosos, o lactato produzido pela glicólise anaeróbica no músculo esquelético retorna para o fígado e é convertido em glicose, que volta para os músculos e é convertida em glicogênio – circuito chamado de ciclo de Cori (Quadro 14-2; ver também Figura 23-21). Em sementes de plantas, as gorduras e as proteínas estocadas nas sementes são convertidas, por vias que incluem a gliconeogênese, no dissacarídeo sacarose para o transporte ao longo da planta em desenvolvimento. A glicose e seus derivados são precursores para a síntese de paredes celulares, nucleotídeos, coenzimas e uma série de outros metabólitos essenciais das plantas. Em muitos microrganismos, a gliconeogênese inicia a partir de compostos orgânicos simples de dois ou três carbonos, como acetato, lactato e propionato, presentes em seu meio de crescimento.

Embora as reações da gliconeogênese sejam as mesmas em todos os organismos, o contexto metabólico e a regulação da via diferem de uma espécie para outra e de tecido para tecido. Nesta seção, analisa-se a gliconeogênese e como ela ocorre no fígado de mamíferos. No Capítulo 20, é mostrado como organismos fotossintéticos usam essa via para converter os produtos primários da fotossíntese em glicose, para ser estocada como sacarose ou amido.

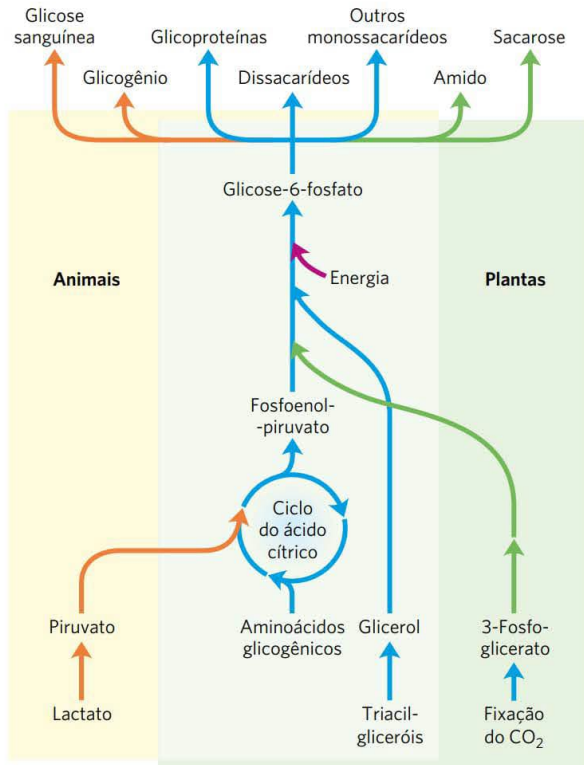


FIGURA 14-16 Síntese de carboidratos a partir de precursores simples. A via a partir de fosfoenolpiruvato até glicose-6-fosfato é comum para a conversão biossintética de muitos precursores diferentes de carboidratos em animais e plantas. A via partindo de piruvato a fosfoenolpiruvato passa por oxalacetato, um intermediário do ciclo do ácido cítrico, discutido no Capítulo 16. Qualquer composto que possa ser convertido em piruvato ou oxalacetato pode, consequentemente, servir como material inicial para a gliconeogênese. Isso inclui alanina e aspartato, que podem ser convertidos em piruvato e oxalacetato, respectivamente, e outros aminoácidos que também podem gerar fragmentos de três ou quatro carbonos, os chamados aminoácidos glicogênicos (ver Tabela 14-4; ver também Figura 18-15). Plantas e bactérias fotossintetizantes são as únicas capazes de converter CO_2 em carboidratos, usando o ciclo de Calvin (ver Seção 20.5).

A gliconeogênese e a glicólise não são vias idênticas correndo em sentidos opostos, embora compartilhem várias etapas (**Figura 14-17**); 7 das 10 reações enzimáticas da gliconeogênese são o inverso das reações glicolíticas. No entanto, três reações da glicólise são essencialmente irreversíveis *in vivo* e não podem ser utilizadas na gliconeogênese: a conversão de glicose em glicose-6-fosfato pela hexocinase, a fosforilação da frutose-6-fosfato em frutose-1,6-bisfosfato pela fosfofrutocinase 1 e a conversão de fosfoenolpiruvato em piruvato pela piruvato-cinase (**Figura 14-17**). Nas células, essas três reações são caracterizadas por uma grande variação negativa da energia livre, ao passo que outras reações glicolíticas têm ΔG próximo de zero (Tabela 14-2). Na gliconeogênese, as três etapas irreversíveis são contornadas por um grupo distinto de enzimas, catalisando reações sufi-

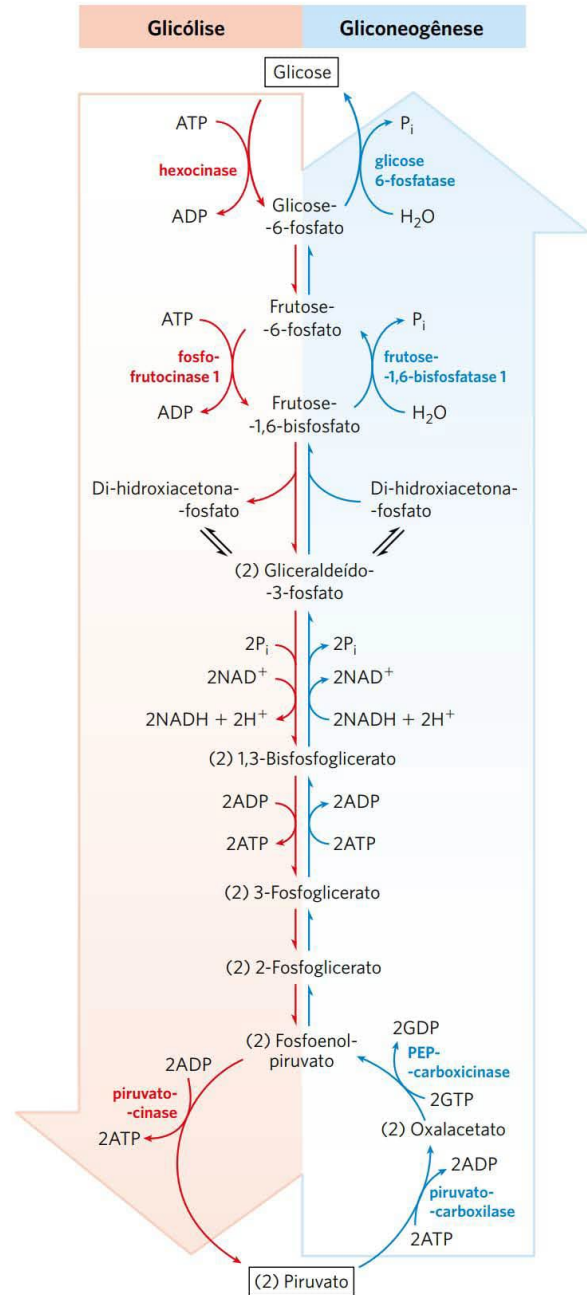


FIGURA 14-17 Vias opostas da glicólise e da gliconeogênese em fígado de rato. As reações da glicólise estão do lado esquerdo, em vermelho; a via oposta, a gliconeogênese, está mostrada do lado direito, em azul. Os principais pontos de regulação da gliconeogênese representados aqui são discutidos posteriormente neste capítulo e em detalhes no Capítulo 15. A Figura 14-20 ilustra uma rota alternativa para a produção de oxalacetato na mitocôndria.

cientemente exergônicas para serem efetivamente irreversíveis no sentido da síntese de glicose. Assim, tanto a glicólise quanto a gliconeogênese são processos irreversíveis nas

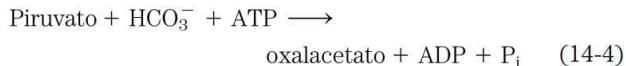
células. Em animais, as duas vias ocorrem principalmente no citosol, necessitando de regulação recíproca e coordenada. A regulação separada das duas vias é atingida por meio de controles exercidos nas etapas enzimáticas existentes em apenas uma das vias.

Inicialmente, consideraremos as três reações de contorno da gliconeogênese. (Tenha em mente que “contorno” se refere ao contorno das reações irreversíveis da via glicolítica.)

A conversão de piruvato em fosfoenolpiruvato requer duas reações exergônicas

A primeira reação de contorno da gliconeogênese é a conversão de piruvato em fosfoenolpiruvato (PEP). Essa reação não pode ocorrer por uma simples inversão da reação da piruvato-cinase da glicólise (p. 544), que tem uma grande variação negativa da energia livre e é, portanto, irreversível em condições que prevalecem nas células intactas (Tabela 14-2, etapa 10). Assim, a fosforilação do piruvato é alcançada por uma sequência de reações de desvio que, em eucariotos, requer enzimas existentes tanto no citosol como nas mitocôndrias. Como será visto, a via representada na Figura 14-17 e descrita em detalhes aqui é uma das duas rotas que levam de piruvato a PEP; essa é a via predominante quando piruvato e alanina são os precursores glicogênicos. Uma segunda via, descrita posteriormente, predomina quando o lactato é o precursor glicogênico.

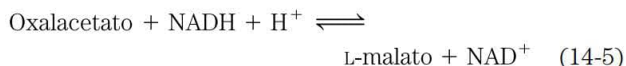
O piruvato é primeiramente transportado do citosol para a mitocôndria ou é gerado dentro da mitocôndria a partir da transaminação da alanina; nessa reação, o grupo α -amino é transferido da alanina (gerando piruvato) para um α -cetoácido (reações de transaminação são discutidas em detalhes no Capítulo 18). A seguir, a **piruvato-carboxilase**, uma enzima mitocondrial que requer a coenzima **biotina**, converte o piruvato em oxalacetato (Figura 14-18):



A reação de carboxilação envolve biotina como transportador de bicarbonato ativado, como representado na Figura 14-19; o mecanismo da reação está mostrado na Figura 16-17. (Observe que HCO_3^- é formado pela ionização do ácido carbônico produzido a partir de $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$.) O HCO_3^- é fosforilado por ATP para formar um anidrido misto (carboxi-fosfato); a seguir, a biotina desloca o fosfato na formação de carboxibiotina.

A piruvato-carboxilase é a primeira enzima de regulação na via gliconeogênica, necessitando de acetil-CoA como efetor positivo. (Acetil-CoA é produzida pela oxidação de ácidos graxos [Capítulo 17], e seu acúmulo sinaliza a disponibilidade de ácidos graxos como combustível.) Como será visto no Capítulo 16 (ver Figura 16-16), a reação da piruvato-carboxilase pode reconstituir intermediários de outra via metabólica central, o ciclo do ácido cítrico.

Como a membrana mitocondrial não tem transportador para o oxalacetato, antes de ser exportado para o citosol, o oxalacetato formado a partir do piruvato deve ser reduzido a malato pela **malato-desidrogenase** mitocondrial, com o consumo de NADH:



A variação de energia livre padrão para esta reação é muito alta, porém, em condições fisiológicas (inclusive uma concentração muito baixa de oxalacetato), $\Delta G \approx 0$ e a reação é prontamente reversível. A malato-desidrogenase mitocondrial age tanto na gliconeogênese como no ciclo do ácido cítrico, mas o fluxo global dos metabólitos nos dois processos ocorre em sentidos opostos.

O malato deixa a mitocôndria por meio de um transportador específico presente na membrana mitocondrial inter-

TABELA 14-2 Variação de energia livre das reações glicolíticas em eritrócitos

Etapas da reação glicolítica	$\Delta G'^{\circ}$ (kJ/mol)	ΔG (kJ/mol)
1 Glicose + ATP \longrightarrow glicose-6-fosfato + ADP	-16,7	-33,4
2 Glicose-6-fosfato \rightleftharpoons frutose-6-fosfato	1,7	0 a 25
3 Frutose-6-fosfato + ATP \longrightarrow frutose-1,6-bisfosfato + ADP	-14,2	-22,2
4 Frutose-1,6-bisfosfato \rightleftharpoons di-hidroxiacetona-fosfato + gliceraldeído-3-fosfato	23,8	-6 a 0
5 Di-hidroxiacetona-fosfato \rightleftharpoons gliceraldeído-3-fosfato	7,5	0 a 4
6 Gliceraldeído-3-fosfato + P_i + NAD^+ \rightleftharpoons 1,3-bisfosfoglicerato + NADH + H^+	6,3	-2 a 2
7 1,3-Bisfosfoglicerato + ADP \rightleftharpoons 3-fosfoglicerato + ATP	-18,8	0 a 2
8 3-Fosfoglicerato \rightleftharpoons 2-fosfoglicerato	4,4	0 a 0,8
9 2-Fosfoglicerato \rightleftharpoons fosfoenolpiruvato + H_2O	7,5	0 a 3,3
10 Fosfoenolpiruvato + ADP \longrightarrow piruvato + ATP	-31,4	-16,7

Nota: $\Delta G'^{\circ}$ é a variação de energia livre padrão, como definido no Capítulo 13 (pp. 497-498). ΔG é a variação de energia livre calculada a partir das concentrações reais dos intermediários glicolíticos presentes em condições fisiológicas nos eritrócitos, em pH 7. As reações glicolíticas que são contornadas na gliconeogênese estão mostradas em vermelho. As equações bioquímicas não são necessariamente equilibradas para H ou carga (pp. 506-507).

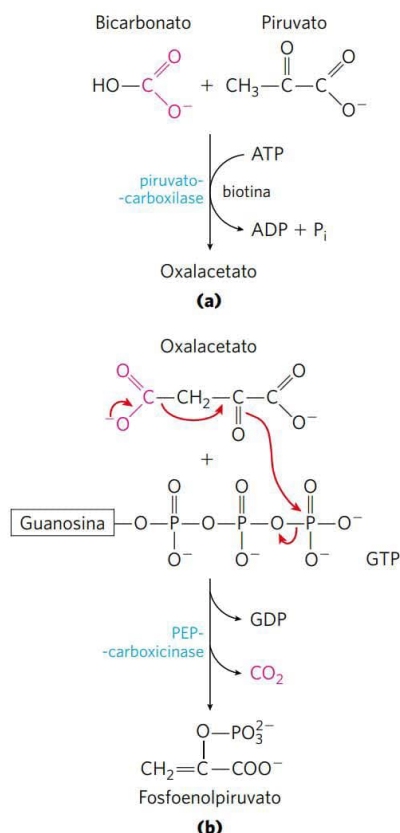


FIGURA 14-18 Síntese de fosfoenolpiruvato a partir de piruvato.

(a) Na mitocôndria, o piruvato é convertido em oxalacetato em uma reação dependente de biotina, catalisada pela piruvato-carboxilase. (b) No citosol, o oxalacetato é convertido em fosfoenolpiruvato pela PEP-carboxicinasase. O CO_2 incorporado na reação da piruvato-carboxilase é perdido aqui como CO_2 . A descarboxilação leva a um rearranjo de elétrons que facilita o ataque do oxigênio da carbonila da porção piruvato sobre o fosfato γ do GTP.

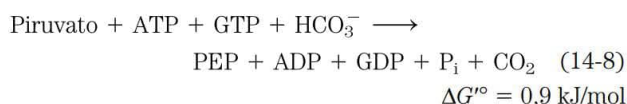
na (ver Figura 19-31), e, no citosol, ele é reoxidado a oxalacetato, com a produção de NADH citosólico:



O oxalacetato é, então, convertido em PEP pela **fosfoenolpiruvato-carboxicinasase** (Figura 14-18). Esta reação é dependente de Mg^{2+} e requer GTP como doador de grupo fosforila:



A reação é reversível em condições intracelulares; a formação de um composto de fosfato de alta energia (PEP) é equilibrada pela hidrólise de outro composto (GTP). A equação global para esse conjunto de reações de contorno é a soma das Equações 14-4 até 14-7:



Dois grupos fosfato de alta energia (um do ATP e um do GTP), cada um gerando em torno de 50 kJ/mol em condições celulares, devem ser gastos para fosforilar uma molécula de piruvato a PEP. Ao contrário, quando PEP é convertido em piruvato durante a glicólise, apenas um ATP é gerado a partir de ADP. Embora a variação da energia livre padrão ($\Delta G'^{\circ}$) da via de duas etapas da conversão de piruvato em PEP seja de 0,9 kJ/mol, a variação de energia livre real (ΔG), calculada a partir das medidas das concentrações celulares dos intermediários, é altamente negativa (-25 kJ/mol); isso é consequência do consumo rápido de PEP em outras reações, de modo que sua concentração permanece relativamente baixa. A reação é, assim, efetivamente irreversível na célula.

Observe que o CO_2 adicionado ao piruvato na etapa catalisada pela piruvato-carboxilase é a mesma molécula perdida na reação da PEP-carboxicinasase (Figura 14-18b).

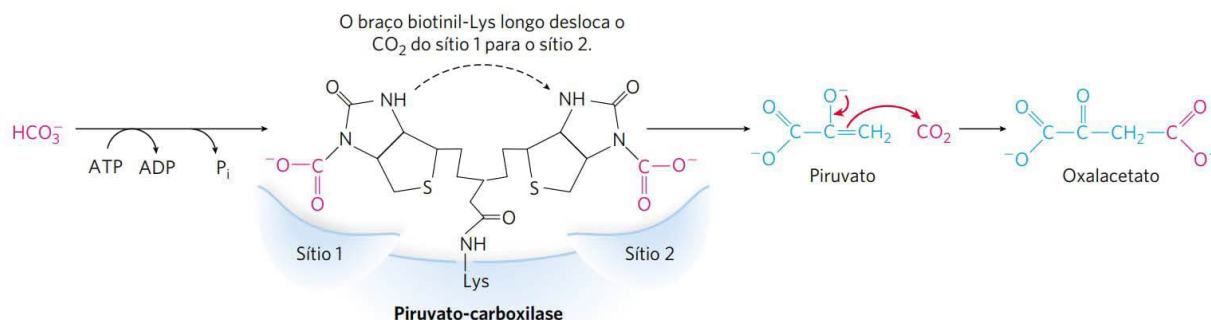


FIGURA 14-19 Papel da biotina na reação da piruvato-carboxilase. O cofator biotina está ligado covalentemente à enzima por uma ligação amida com o grupo ϵ -amino de um resíduo de Lys, formando uma biotinil-enzima. A reação ocorre em duas fases, em dois sítios diferentes da enzima. No sítio catalítico 1, o íon bicarbonato é convertido em CO_2 com gasto de ATP. Em seguida, o CO_2 reage com a biotina, formando carboxibiotinil-enzima. O braço longo composto pela biotina e pela cadeia lateral da Lys à qual ela está ligada transporta o CO_2 da carboxibiotinil-enzima para o sítio catalítico 2 na superfície da enzima, onde o CO_2 é liberado e reage com o piruvato, formando oxalacetato e regenerando o complexo biotinil-enzima. A função geral dos braços flexíveis no transporte de intermediários de reação entre sítios ativos de enzimas está descrita na Figura 16-18, e os detalhes do mecanismo da reação da piruvato-carboxilase estão mostrados na Figura 16-17. Mecanismos semelhantes ocorrem em outras reações de carboxilação dependentes de biotina, como as catalisadas pela propionil-CoA-carboxilase (ver Figura 17-12) e pela acetil-CoA-carboxilase (ver Figura 21-1).

Essa sequência de carboxilação-descarboxilação representa uma forma de “ativar” o piruvato, pois a descarboxilação do oxalacetato facilita a formação de PEP. No Capítulo 21, será visto como uma sequência semelhante de carboxilação-descarboxilação é usada para ativar acetil-CoA para a síntese de ácidos graxos (ver Figura 21-1).

Existe uma lógica na rota dessas reações na mitocôndria. A relação $[NADH]/[NAD^+]$ no citosol é 8×10^{-4} , cerca de 10^5 vezes menor do que na mitocôndria. Como o NADH citosólico é consumido na gliconeogênese (na conversão de 1,3-bisfosfoglicerato em gliceraldeído-3-fosfato; Figura 14-17), a biossíntese de glicose não pode ocorrer a menos que o NADH esteja disponível. O transporte de malato da mitocôndria ao citosol e a sua conversão em oxalacetato transfere efetivamente equivalentes redutores para o citosol, onde eles são escassos. Assim, essa transformação de piruvato em PEP proporciona um equilíbrio importante entre NADH produzido e consumido no citosol durante a gliconeogênese.

Outra forma de contornar a reação da piruvato-cinase, para transformar piruvato em PEP, predomina quando o lactato é o precursor glicogênico (Figura 14-20). Essa via faz uso do lactato produzido pela glicólise nos eritrócitos ou no músculo anaeróbico, por exemplo, sendo particularmente importante em vertebrados de grande porte após exercício vigoroso (Quadro 14-2). A conversão de lactato em piruvato no citosol de hepatócitos gera NADH, e a exportação de equivalentes redutores (como malato) da mitocôndria é consequentemente desnecessária. Depois que o piruvato produzido na reação da lactato-desidrogenase é transportado para a mitocôndria, ele é convertido em oxalacetato pela piruvato-carboxilase, como descrito anteriormente. Esse oxalacetato, no entanto, é convertido diretamente em PEP por uma isoenzima mitocondrial da PEP-carboxicinas, e o PEP é transportado para fora da mitocôndria para dar continuidade à via gliconeogênica. As isoenzimas mitocondriais e citosólicas da PEP-carboxicinas são codificadas por genes separados nos cromossomos nucleares, proporcionando outro exemplo de duas enzimas distintas catalisando a mesma reação, mas em localizações celulares ou com papéis metabólicos diferentes (lembre-se das isoenzimas da hexocinase).

A conversão de frutose-1,6-bisfosfato em frutose-6-fosfato é a segunda reação que deve ser contornada

A segunda reação glicolítica que não pode participar da gliconeogênese é a fosforilação da frutose-6-fosfato pela PFK-1 (Tabela 14-2, etapa 3). Como essa reação é altamente exergônica e por isso irreversível em células intactas, a geração de frutose-6-fosfato a partir de frutose-1,6-bisfosfato (Figura 14-17) é catalisada por uma enzima diferente, dependente de Mg^{2+} , a **frutose-1,6-bisfosfatase (FBPase-1)**, que promove a *hidrólise* essencialmente irreversível do fosfato no C-1 (e não a transferência do grupo fosforila para o ADP):

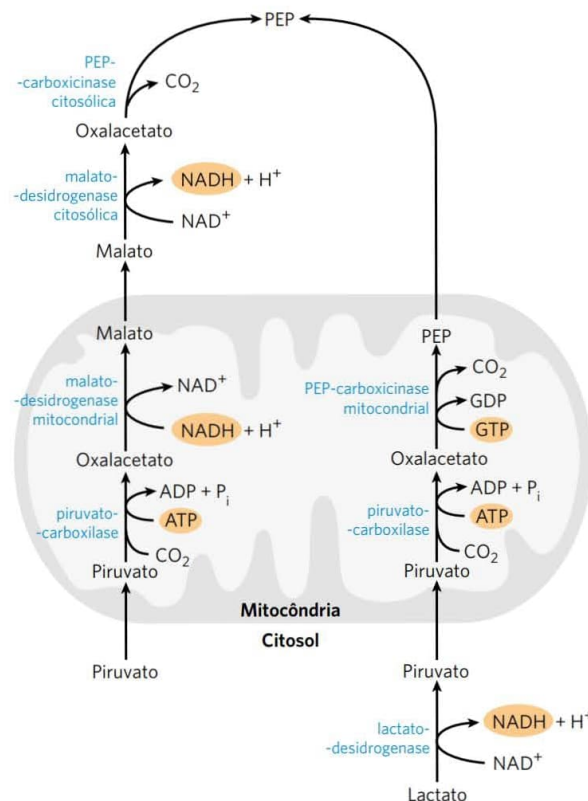
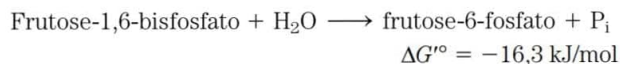
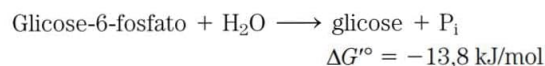


FIGURA 14-20 Vias alternativas da transformação do piruvato em fosfoenolpiruvato. A importância relativa das duas vias depende da disponibilidade de lactato ou piruvato e das necessidades citosólicas de NADH para a gliconeogênese. A via à direita predomina quando o lactato é o precursor, já que NADH citosólico é gerado na reação da lactato-desidrogenase e não precisa ser transportado para fora da mitocôndria (ver texto).

A FBPase-1 é assim chamada para distingui-la de outra enzima semelhante (FBPase-2) com função de regulação, discutida no Capítulo 15.

A conversão de glicose-6-fosfato em glicose é o terceiro ponto a ser contornado

O terceiro ponto a ser contornado é a reação final da gliconeogênese, a desfosforilação da glicose-6-fosfato para formar glicose (Figura 14-17). O inverso da reação da hexocinase (p. 538) exigiria a transferência de um grupo fosforila da glicose-6-fosfato para o ADP, formando ATP, uma reação energeticamente desfavorável (Tabela 14-2, etapa 1). A reação catalisada pela **glicose-6-fosfatase** não requer a síntese de ATP, sendo a hidrólise simples de uma ligação éster fosfato:

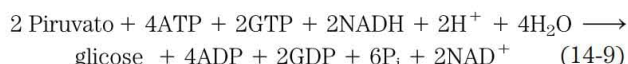


Essa enzima ativada por Mg^{2+} é encontrada no lado luminal do retículo endoplasmático de hepatócitos, de células re-

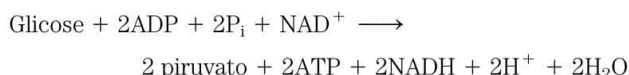
nais e das células epiteliais do intestino delgado (ver Figura 15-30), mas não é encontrada em outros tecidos, que são, portanto, incapazes de fornecer glicose para o sangue. Se outros tecidos tivessem a glicose-6-fosfatase, essa atividade enzimática hidrolisaria a glicose-6-fosfato necessária para a glicólise nesses tecidos. A glicose produzida pela gliconeogênese no fígado, nos rins ou ingerida na dieta é entregue a esses outros tecidos, incluindo o encéfalo e os músculos, pela corrente sanguínea.

A gliconeogênese é energeticamente dispendiosa, mas essencial

A soma das reações biossintéticas que levam de piruvato até glicose livre no sangue (Tabela 14-3) é



Para cada molécula de glicose formada a partir do piruvato, seis grupos fosfato de alta energia são necessários, quatro provenientes do ATP e dois do GTP. Além disso, duas moléculas de NADH são necessárias para a redução de duas moléculas de 1,3-bisfosfoglicerato. Evidentemente, a Equação 14-9 não é simplesmente o inverso da equação para a conversão de glicose em piruvato pela glicólise, que exigiria apenas duas moléculas de ATP:



A síntese de glicose a partir de piruvato é um processo relativamente dispendioso. A maior parte desse alto custo energético é necessária para assegurar a irreversibilidade

da gliconeogênese. Em condições intracelulares, a variação de energia livre padrão global da glicólise é pelo menos -63 kJ/mol . Sob as mesmas condições, o ΔG global para a gliconeogênese é -16 kJ/mol . Assim, tanto a glicólise como a gliconeogênese são processos essencialmente irreversíveis nas células. Uma segunda vantagem em investir energia para converter piruvato em glicose é que, se o piruvato fosse excretado, seu considerável potencial para formação de ATP pela completa oxidação aeróbica seria perdido (mais de 10 ATP são formados por piruvato, como será visto no Capítulo 16).

Os intermediários do ciclo do ácido cítrico e alguns aminoácidos são glicogênicos

A via biossintética para a formação de glicose descrita anteriormente permite a síntese líquida de glicose não apenas a partir de piruvato, mas também dos intermediários do ciclo do ácido cítrico com quatro, cinco e seis carbonos (Capítulo 16). Citrato, isocitrato, α -cetoglutarato, succinil-CoA, succinato, fumarato e malato – todos são intermediários do ciclo do ácido cítrico que podem sofrer oxidação a oxalacetato (ver Figura 16-7). Alguns ou todos os átomos de carbono da maior parte dos aminoácidos derivados das proteínas são, em última análise, catabolizados a piruvato ou intermediários do ciclo do ácido cítrico. Esses aminoácidos podem, portanto, ser convertidos em glicose e são chamados de **glicogênicos** (Tabela 14-4). A alanina e a glutamina, as principais moléculas que transportam grupos amino de tecidos extra-hepáticos até o fígado (ver Figura 18-9), são aminoácidos glicogênicos particularmente importantes em mamíferos. Após a retirada de seus grupos amino na mitocôndria dos hepatócitos, os esqueletos de carbono remanescentes (piruvato e

TABELA 14-3 Reações sequenciais na gliconeogênese a partir do piruvato

Piruvato + $\text{HCO}_3^- + \text{ATP} \longrightarrow \text{oxalacetato} + \text{ADP} + \text{P}_i$	×2
Oxalacetato + $\text{GTP} \rightleftharpoons \text{fosfoenolpiruvato} + \text{CO}_2 + \text{GDP}$	×2
Fosfoenolpiruvato + $\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons 2\text{-fosfoglicerato}$	×2
2-Fosfoglicerato $\rightleftharpoons 3\text{-fosfoglicerato}$	×2
3-Fosfoglicerato + $\text{ATP} \rightleftharpoons 1,3\text{-bisfosfoglicerato} + \text{ADP}$	×2
1,3-Bisfosfoglicerato + $\text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{gliceraldeído-3-fosfato} + \text{NAD}^+ + \text{P}_i$	×2
Gliceraldeído-3-fosfato $\rightleftharpoons \text{di-hidroxiacetona-fosfato}$	
Gliceraldeído-3-fosfato + di-hidroxiacetona-fosfato $\rightleftharpoons \text{frutose-1,6-bisfosfato}$	
Frutose-1,6-bisfosfato $\longrightarrow \text{frutose-6-fosfato} + \text{P}_i$	
Frutose-6-fosfato $\rightleftharpoons \text{glicose-6-fosfato}$	
Glicose-6-fosfato + $\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{glicose} + \text{P}_i$	
Soma: $2 \text{ Piruvato} + 4\text{ATP} + 2\text{GTP} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+ + 4\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{glicose} + 4\text{ADP} + 2\text{GDP} + 6\text{P}_i + 2\text{NAD}^+$	

Nota: as reações que contornam reações irreversíveis da glicólise estão em vermelho; todas as outras reações são etapas reversíveis da glicólise. Os números à direita indicam que a reação é para ser contada duas vezes, já que dois precursores de três carbonos são necessários para fazer uma molécula de glicose. As reações necessárias para substituir o NADH citosólico consumido na reação da gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (a conversão de lactato em piruvato no citosol ou o transporte de equivalentes redutores da mitocôndria para o citosol na forma de malato) não estão consideradas neste resumo. As equações bioquímicas não estão necessariamente equilibradas para H e carga elétrica (p. 498).

TABELA 14-4 Aminoácidos glicogênicos, agrupados conforme o local de entrada

Piruvato	Succinil-CoA
Alanina	Isoleucina ^a
Cisteína	Metionina
Glicina	Treonina
Serina	Valina
Treonina	Fumarato
Triptofano ^a	Fenilalanina ^a
α-Cetoglutarato	Tirosina ^a
Arginina	Oxalacetato
Glutamato	Asparagina
Glutamina	Aspartato
Histidina	
Prolina	

Nota: todos esses aminoácidos são precursores da glicose sanguínea ou do glicogênio hepático, já que eles podem ser convertidos em piruvato ou intermediários do ciclo do ácido cítrico. Dos 20 aminoácidos comuns, apenas a leucina e a lisina são incapazes de fornecer carbonos para a síntese líquida de glicose.

^aEsses aminoácidos também são cetogênicos (ver Figura 18-15).

α -cetoglutarato, respectivamente) são prontamente canalizados para a gliconeogênese.

Os mamíferos não podem converter ácidos graxos em glicose

Nos mamíferos, não ocorre a conversão líquida de ácidos graxos em glicose. Como será visto no Capítulo 17, o catabolismo da maior parte dos ácidos graxos gera apenas acetil-CoA. Os mamíferos não podem usar a acetil-CoA como um precursor da glicose, já que a reação da piruvato-desidrogenase é irreversível e as células não possuem outra via para converter acetil-CoA em piruvato. Os vegetais, as leveduras e muitas bactérias possuem uma via (o ciclo do glioxilato; ver Figura 20-55) para converter acetil-CoA em oxalacetato, portanto esses organismos podem utilizar ácidos graxos como matéria-prima para a gliconeogênese. Isso é importante durante a germinação das sementes, por exemplo; antes do desenvolvimento das folhas e da fotossíntese fornecerem energia e carboidratos, as plântulas contam com os estoques de óleo das sementes para a produção de energia e para a biossíntese da parede celular.

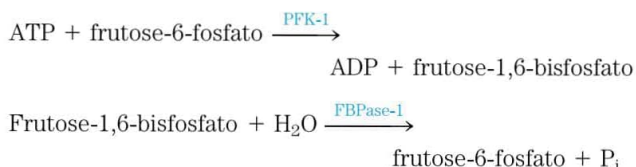
Apesar dos mamíferos não converterem ácidos graxos em carboidratos, eles podem usar a pequena quantidade de glicerol produzido na quebra das gorduras (*triacilgliceróis*) para a gliconeogênese. A fosforilação do glicerol pela glicerol-cinase, seguida pela oxidação do carbono central, gera di-hidroxiacetona-fosfato, intermediário da gliconeogênese no fígado.

Como será visto no Capítulo 21, o glicerol-fosfato é um intermediário essencial na síntese de triacilgliceróis nos adipócitos, mas essas células não têm glicerol-cinase e, portanto, não podem simplesmente fosforilar o glicerol. Em vez disso, os adipócitos realizam uma versão truncada

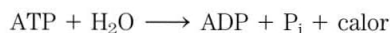
da gliconeogênese, conhecida como **gliceroneogênese**: a conversão de piruvato em di-hidroxiacetona-fosfato pelas reações iniciais da gliconeogênese, seguida pela redução da di-hidroxiacetona-fosfato em glicerol-fosfato (ver Figura 21-21).

A glicólise e a gliconeogênese são reguladas mutuamente

Se a glicólise (a conversão de glicose em piruvato) e a gliconeogênese (a conversão de piruvato em glicose) ocorressem simultaneamente em taxas altas, o resultado seria o consumo de ATP e a produção de calor. Por exemplo, a PFK-1 e a FBPase-1 catalisam reações opostas:



A soma dessas duas reações é



Essas duas reações enzimáticas, e várias outras nas duas vias, são reguladas alostericamente e por modificações covalentes (fosforilação). No Capítulo 15, serão vistos os mecanismos desta regulação em detalhes. Por ora, basta dizer que as vias são reguladas de forma que, quando o fluxo de glicose por meio da glicólise aumenta, o fluxo de piruvato em direção à glicose diminui, e vice-versa.

RESUMO 14.4 Gliconeogênese

- A gliconeogênese é um processo ubíquo e de múltiplas etapas em que a glicose é produzida a partir de lactato, piruvato ou oxalacetato, ou qualquer composto, incluindo os intermediários do ciclo do ácido cítrico, que possa ser convertido a um desses intermediários. Sete etapas da gliconeogênese são catalisadas pelas mesmas enzimas usadas na glicólise; essas são as reações reversíveis.
- Três etapas irreversíveis na glicólise são contornadas por reações catalisadas pelas enzimas gliconeogênicas: (1) a conversão de piruvato em PEP via oxalacetato, catalisada pela piruvato-carboxilase e pela PEP-carboxicinase; (2) a desfosforilação da frutose-1,6-bisfosfato pela FBPase-1; e (3) a desfosforilação da glicose-6-fosfato pela glicose-6-fosfatase.
- A formação de uma molécula de glicose a partir de piruvato requer 4 ATP, 2 GTP e 2 NADH, o que é dispendioso.
- Em mamíferos, a gliconeogênese no fígado, nos rins e no intestino delgado gera glicose para uso pelo encéfalo, pelos músculos e pelos eritrócitos.

- A piruvato-carboxilase é estimulada por acetil-CoA, aumentando a taxa da gliconeogênese quando as células dispõem do fornecimento adequado de outros substratos (ácidos graxos) para a produção de energia.
- Os animais não conseguem converter acetil-CoA, derivada dos ácidos graxos, em glicose; vegetais e microrganismos, sim.
- A glicólise e a gliconeogênese são reguladas mutuamente para prevenir o gasto que ocorreria caso as duas vias operassem ao mesmo tempo.

14.5 Oxidação da glicose pela via das pentoses-fosfato

Na maioria dos tecidos animais, o principal destino catabólico da glicose-6-fosfato é a degradação glicolítica até piruvato, cuja maior parte é, então, oxidada pelo ciclo do ácido cítrico, levando enfim à formação de ATP. No entanto, a glicose-6-fosfato tem outros destinos catabólicos, que levam a produtos especializados, necessários para a célula. De grande importância em alguns tecidos é a oxidação da glicose-6-fosfato até pentoses-fosfato pela **via das pentoses-fosfato** (também chamada de **via do fosfogliconato** ou **via das hexoses-monofosfato**; **Figura 14-21**). Nessa via de oxidação, NADP^+ é o aceptor de elétrons, gerando NADPH. As células que se dividem rapidamente, como aquelas da medula óssea, da pele e da mucosa intestinal, assim como aquelas de tumores, utilizam a pentose ribose-5-fosfato para produzir RNA, DNA e coenzimas como ATP, NADH, FADH_2 e coenzima A.

Em alguns tecidos, o produto essencial da via das pentoses-fosfato não são as pentoses, mas o doador de elétrons NADPH, necessário para as reduções biossintéticas ou para contrapor os efeitos deletérios dos radicais de oxigênio. Os tecidos em que ocorre a síntese de grande quantidade de ácidos graxos (fígado, tecido adiposo, glândulas mamárias durante a lactação) ou a síntese muito ativa de colesterol e hormônios esteroides (fígado, glândulas suprarrenais e gônadas) utilizam o NADPH produzido por essa via. Os eritrócitos e as células da córnea e do cristalino estão diretamente expostos ao oxigênio e, por isso, aos efeitos danosos dos radicais livres gerados pelo oxigênio. Por manter um ambiente redutor (uma relação alta de NADPH para NADP^+ assim como uma forma reduzida para a forma oxidada da glutatona), essas células podem impedir ou reverter o dano oxidativo de proteínas, lipídeos e outras moléculas sensíveis. Nos eritrócitos, o NADPH produzido pela via das pentoses-fosfato é tão importante em impedir o dano oxidativo que um defeito genético na glicose-6-fosfato-desidrogenase, a primeira enzima da via, pode causar sérias consequências médicas (Quadro 14-4). ■

A fase oxidativa produz pentoses-fosfato e NADPH

A primeira reação da via das pentoses-fosfato (**Figura 14-22**) é a oxidação da glicose-6-fosfato pela **glicose-6-fosfato-de-**

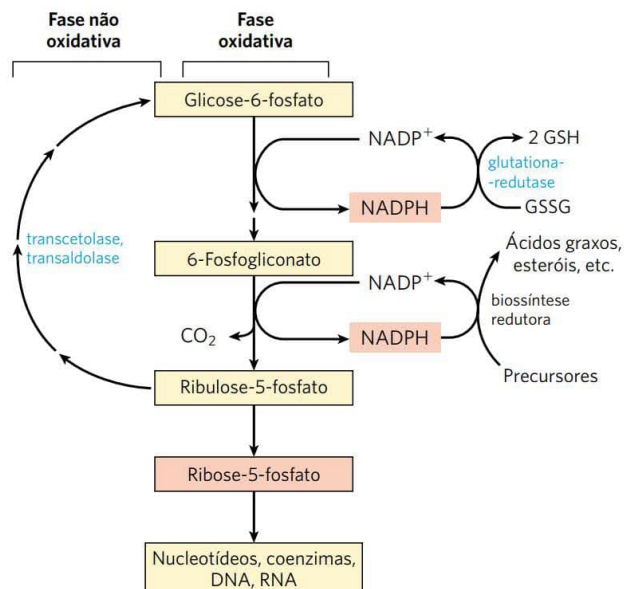
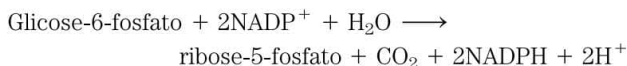


FIGURA 14-21 Esquema geral da via das pentoses-fosfato. O NADPH formado na fase oxidativa é utilizado para reduzir a glutatona, GSSG (ver Quadro 14-4) e dar suporte para a biossíntese redutora. O outro produto da fase oxidativa é a ribose-5-fosfato, que serve como precursor para nucleotídeos, coenzimas e ácidos nucleicos. Em células que não estão utilizando a ribose-5-fosfato para a biossíntese, a fase não oxidativa recicla seis moléculas da pentose em cinco moléculas da hexose glicose-6-fosfato, permitindo a produção contínua de NADPH e convertendo glicose-6-fosfato (em seis ciclos) em CO_2 .

sidrogenase (G6PD) para formar 6-fosfoglicona- δ -lactona, um éster intramolecular. O NADP^+ é o aceptor de elétrons, e o equilíbrio global está muito deslocado no sentido da formação de NADPH. A lactona é hidrolisada ao ácido livre 6-fosfogliconato por uma **lactonase** específica; o 6-fosfogliconato sofre, então, oxidação e descarboxilação pela **6-fosfogliconato-desidrogenase** para formar a cetopentose ribulose-5-fosfato; a reação gera uma segunda molécula de NADPH. (Essa ribulose-5-fosfato é importante na regulação da glicólise e da gliconeogênese, como será visto no Capítulo 15.) A **fosfopentose-isomerase** converte a ribulose-5-fosfato em seu isômero aldose, ribose-5-fosfato. Em alguns tecidos, a via das pentoses-fosfato termina nesse ponto, e a equação global é



O resultado líquido é a produção de NADPH, agente redutor para as reações biossintéticas, e ribose-5-fosfato, precursor para a síntese de nucleotídeos.

A fase não oxidativa recicla as pentoses-fosfato a glicose-6-fosfato

Em tecidos que necessitam principalmente NADPH, as pentoses-fosfato produzidas na fase oxidativa da via são

QUADRO 14-4



MEDICINA

Por que Pitágoras não comia falafel: deficiência da glicose-6-fosfato-desidrogenase

O feijão-fava, ingrediente do falafel, tem sido uma importante fonte de alimento no Mediterrâneo e no Oriente Médio desde a Antiguidade. O filósofo e matemático grego Pitágoras proibia seus seguidores de se alimentarem de fava, talvez porque ela deixasse muitas pessoas doentes com uma condição chamada de favismo, que pode ser fatal. No favismo, os eritrócitos começam a sofrer lise 24 a 48 horas após a ingestão dos feijões, liberando hemoglobina livre no sangue, podendo resultar em icterícia e, algumas vezes, em falência renal. Sintomas semelhantes podem ocorrer com a ingestão do fármaco contra a malária, primaquina, ou quimioterápicos do tipo sulfa, ou após a exposição a certos herbicidas. Esses sintomas têm uma base genética: a deficiência de glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD), que afeta em torno de 400 milhões de pessoas em todo o mundo. A maioria dos indivíduos deficientes em G6PD é assintomática. Apenas a combinação da deficiência de G6PD e certos fatores ambientais produz as manifestações clínicas.

A glicose-6-fosfato-desidrogenase catalisa a primeira etapa da via das pentoses-fosfato (ver Figura 14-22), que produz NADPH. Esse agente redutor, essencial em muitas vias biossintéticas, também protege as células do dano oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e pelo radical livre superóxido, agentes oxidantes altamente reativos gerados como subprodutos metabólicos e pela ação de fármacos, como a primaquina, e produtos naturais, como a divicina – o ingrediente tóxico do feijão-fava. Durante a destoxificação normal, o H_2O_2 é convertido em H_2O pela glutatona reduzida sob a ação da glutatona-peroxidase, e a glutatona oxidada é convertida de volta à forma reduzida pela glutatona-redutase usando NADPH (Figura Q-1). O H_2O_2 também é degradado a H_2O e O_2 pela catalase, que também requer NADPH. Em indivíduos deficientes em G6PD, a produção de NADPH está diminuída e a destoxificação do H_2O_2 está inibida. Os danos celulares resultantes são peroxidação de lipídeos, levando à degradação das membranas dos eritrócitos, e oxidação de proteínas e do DNA.

A distribuição geográfica da deficiência de G6PD é instrutiva. Frequências tão altas quanto 25% ocorrem na África tropical, em partes do Oriente Médio e no sul da Ásia, áreas onde a malária é mais prevalente. Além dessas observações epidemiológicas, estudos mostram que o crescimento do parasita causador da malária, *Plasmodium falciparum*, é inibido em eritrócitos deficientes em G6PD. O parasita é muito sensível ao dano oxidativo

e morre por um nível de estresse oxidativo tolerável ao hospedeiro humano deficiente em G6PD. Uma vez que a vantagem da resistência à malária equilibra a desvantagem da baixa resistência ao dano oxidativo, a seleção natural mantém o genótipo deficiente em G6PD em populações humanas onde a malária é prevalente. Apenas em condições insuportáveis de estresse oxidativo, causado por fármacos, herbicidas ou divicina, a deficiência de G6PD causa problemas médicos graves.

Acredita-se que um fármaco antimalária, como a primaquina, atue causando estresse oxidativo ao parasita. É irônico que os fármacos contra a malária possam causar doenças em seres humanos pelo mesmo mecanismo bioquímico que leva à resistência à malária. A divicina também age como fármaco antimalária, e a ingestão de feijão-fava pode proteger contra a malária. Recusando-se a comer falafel, muitos pitagóricos com atividade normal da G6PD talvez, inconscientemente, tenham aumentado o risco de contrair malária.

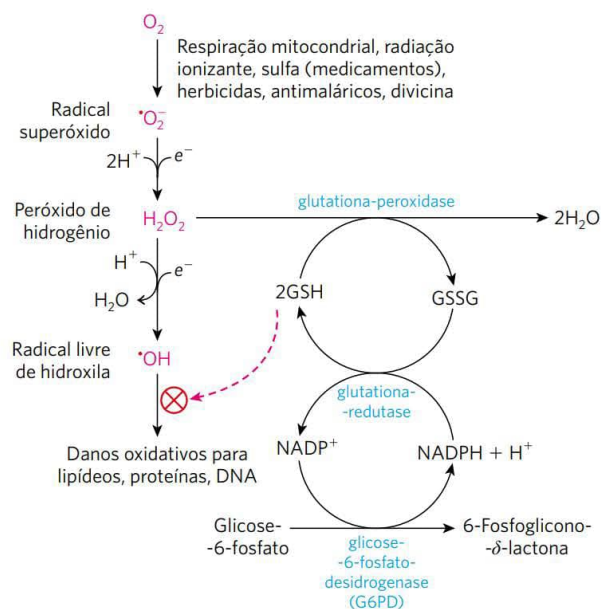


FIGURA Q-1 Papel do NADPH e da glutatona na proteção das células contra espécies altamente reativas de oxigênio. A glutatona reduzida (GSH) protege a célula por destruir o peróxido de hidrogênio e os radicais livres hidroxila. A regeneração de GSH a partir de sua forma oxidada (GSSG) requer NADPH, produzido na reação da glicose-6-fosfato-desidrogenase.

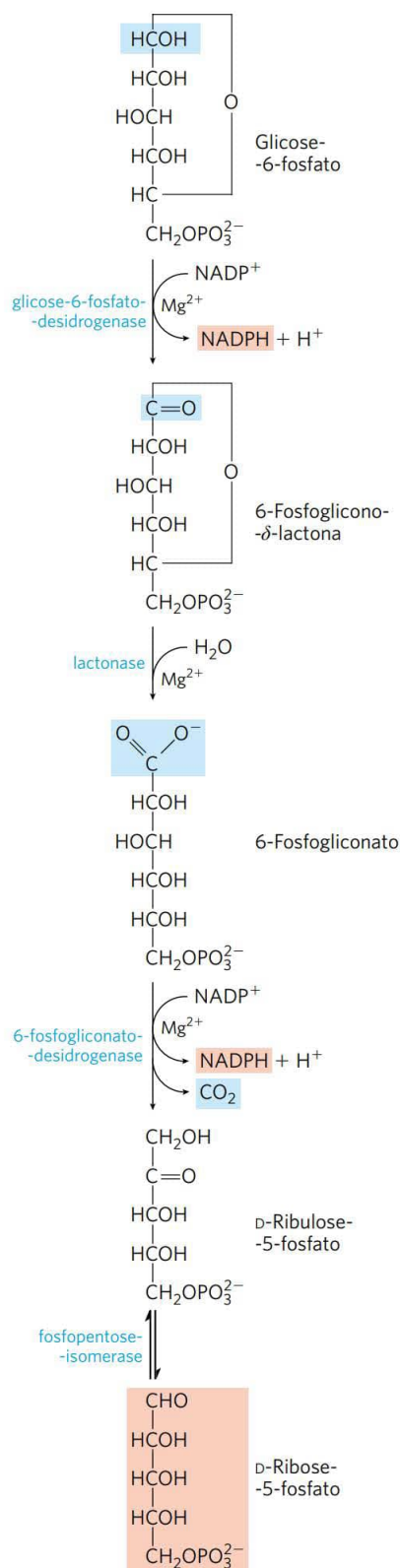
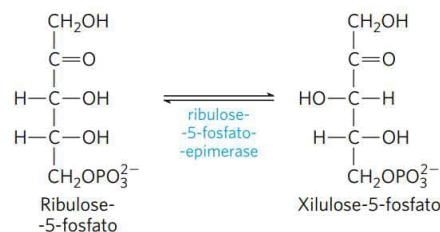


FIGURA 14-22 Reações oxidativas da via das pentoses-fosfato. Os produtos finais são ribose-5-fosfato, CO_2 e NADPH .

recicladadas em glicose-6-fosfato. Nessa fase não oxidativa, a ribulose-5-fosfato é primeiro epimerizada a xilulose-5-fosfato:



A seguir, em uma série de rearranjos dos esqueletos de carbono (**Figura 14-23**), seis moléculas de açúcar-fosfato de cinco átomos de carbono são convertidas em cinco moléculas de açúcar-fosfato com seis átomos de carbono, completando o ciclo e permitindo a oxidação contínua de glicose-6-fosfato com a produção de NADPH . A reciclagem continuada leva, por fim, à conversão de uma molécula de glicose-6-fosfato em seis CO_2 . Duas enzimas exclusivas da via das pentoses-fosfato agem nessas interconversões de açúcares: a **transcetolase** e a **transaldolase**. A **transcetolase** catalisa a transferência de um fragmento de dois carbonos de uma cetose doadora a uma aldose acceptora (**Figura 14-24a**). Em sua primeira aparição na via das pentoses-fosfato, a transcetolase transfere C-1 e C-2 da xilulose-5-fosfato para a ribose-5-fosfato, formando o produto de sete carbonos sedoheptulose-7-fosfato (**Figura 14-24b**). O fragmento de três carbonos remanescente da xilulose é o gliceraldeído-3-fosfato.

Em seguida, a **transaldolase** catalisa uma reação semelhante à reação da aldolase na glicólise: um fragmento de três carbonos é removido da sedoheptulose-7-fosfato e condensado com o gliceraldeído-3-fosfato, formando frutose-6-fosfato e tetrose eritrose-4-fosfato (**Figura 14-25**). Neste ponto, a transcetolase age novamente, formando frutose-6-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato a partir de eritrose-4-fosfato e xilulose-5-fosfato (**Figura 14-26**). Duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato formadas por duas repetições dessas reações podem ser convertidas em uma molécula de frutose-1,6-bisfosfato como na gliconeogênese (**Figura 14-17**), e finalmente a FBPase-1 e a fosfo-hexose-isomerase convertem frutose-1,6-bisfosfato em glicose-6-fosfato. No total, seis pentoses-fosfato são convertidas em cinco hexoses-fosfato (**Figura 14-23b**) – agora o ciclo está completo.

A transcetolase requer o cofator tiamina-pirofosfato (TPP), que estabiliza um carbânion de dois carbonos nessa reação (**Figura 14-27a**), da mesma forma que o faz na reação da piruvato-descarboxilase (**Figura 14-15**). A transaldolase usa a cadeia lateral de uma Lys para formar a base de Schiff com o grupo carbonila de seu substrato, uma cetose, dessa forma estabilizando o carbânion (**Figura 14-27b**) que é central para o mecanismo da reação.

O processo descrito na **Figura 14-22** é conhecido como a **parte oxidativa da via das pentoses-fosfato**. A primeira e a terceira etapas são oxidações com grandes variações negativas de energia livre padrão e são essen-

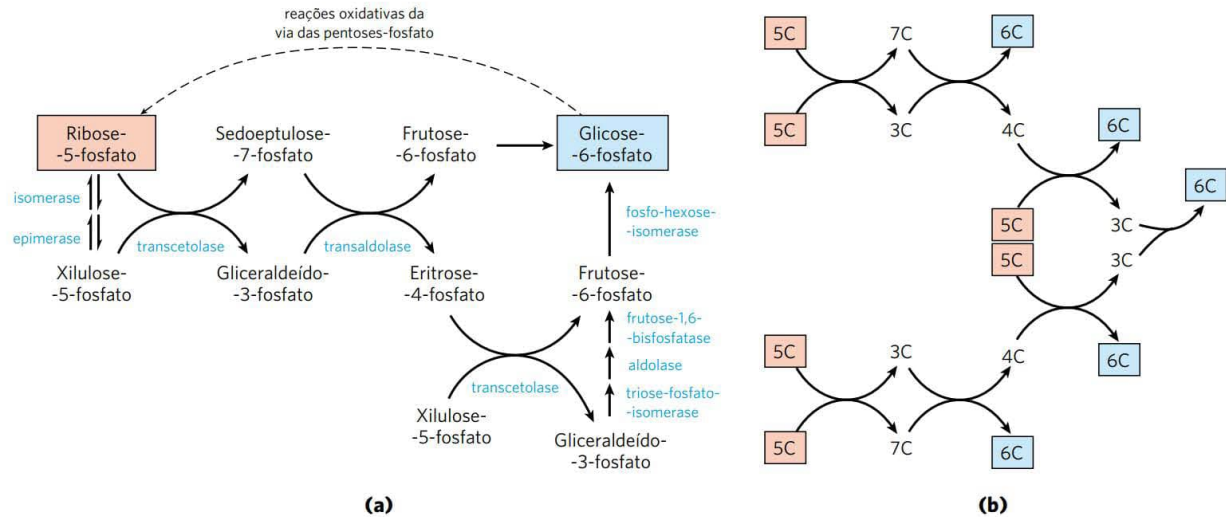
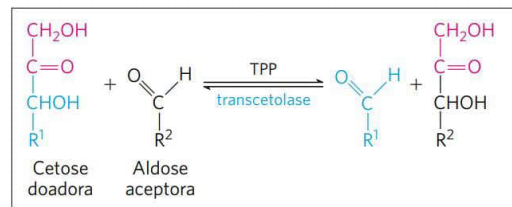


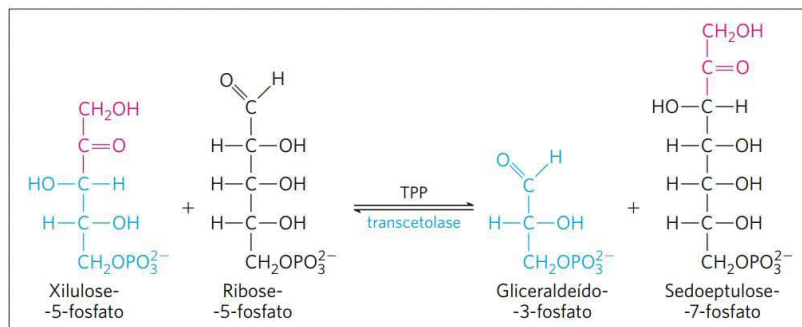
FIGURA 14-23 Reações não oxidativas da via das pentoses-fosfato. **(a)** Essas reações convertem pentoses-fosfato em hexoses-fosfato, permitindo a continuação das reações de oxidação (ver Figura 14-22). A transcetolase e a transaldolase são específicas dessa via; as outras enzimas também participam das vias glicolítica e gliconeogênica. **(b)** Diagrama esquemático mostrando a via a partir de seis pentoses (5C) a cinco hexoses (6C). Observe que isso envolve dois grupos de interconversões mostrados em (a). Todas as reações mostradas aqui são reversíveis; setas unidirecionais são usadas apenas para deixar claro o sentido das reações durante a oxidação contínua da glicose-6-fosfato. Nas reações independentes de luz da fotossíntese, o sentido dessas reações é invertido (ver Figura 20-37).

cialmente irreversíveis na célula. As reações da parte não oxidativa da via das pentoses-fosfato (Figura 14-23) são prontamente reversíveis e, assim, também proporcionam uma maneira de converter hexoses-fosfato em pentoses-fosfato. Como será visto no Capítulo 20, um processo que

converte hexoses-fosfato em pentoses-fosfato é crucial para a fixação fotossintética de CO_2 pelas plantas. Essa via, a **via redutora das pentoses-fosfato**, é essencialmente o inverso das reações mostradas na Figura 14-23 e utiliza muitas das mesmas enzimas.



(a)



(b)

FIGURA 14-24 A primeira reação catalisada pela transcetolase. **(a)** A reação geral catalisada pela transcetolase é a transferência de um grupo de dois carbonos, transportado temporariamente pela TPP ligada à enzima, de uma cetose doadora para uma aldose aceptora. **(b)** Conversão de duas pentoses-fosfato em uma triose-fosfato e um açúcar-fosfato de sete carbonos, sedoheptulose-7-fosfato.

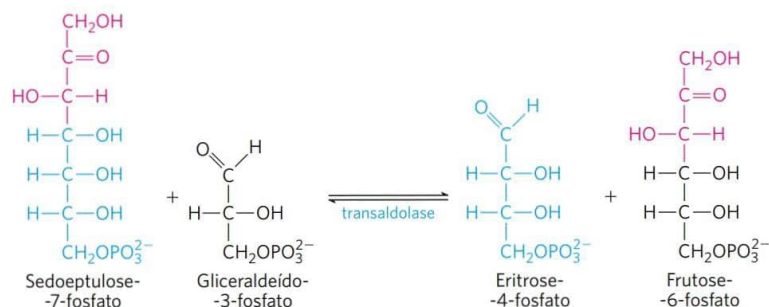


FIGURA 14-25 A reação catalisada pela transaldolase.

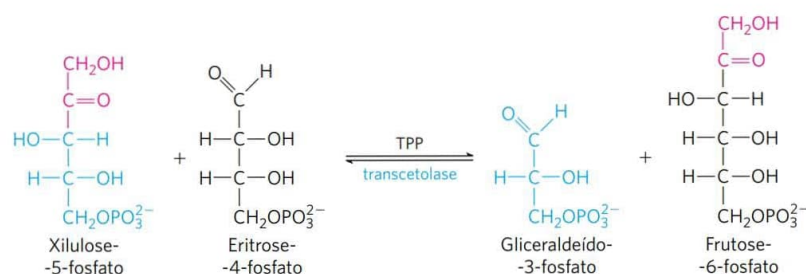


FIGURA 14-26 A segunda reação catalisada pela transcetolase.

Todas as enzimas da via das pentoses-fosfato estão localizadas no citosol, como aquelas da glicólise e a maioria das enzimas da gliconeogênese. De fato, essas três vias estão conectadas por meio de vários intermediários e enzimas compartilhados. O gliceraldeído-3-fosfato formado pela ação da transcetolase é prontamente convertido em di-hidroxiacetona-fosfato pela enzima glicolítica triose-fosfato-isomerase,

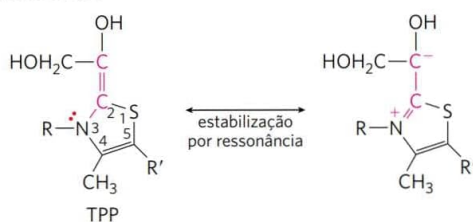
e essas duas trioses podem ser unidas pela aldolase como na gliconeogênese, formando frutose-1,6-bisfosfato. De modo alternativo, as trioses-fosfato podem ser oxidadas a piruvato pelas reações glicolíticas. O destino das trioses é determinado pelas necessidades relativas das células por pentoses-fosfato, NADPH e ATP.

A síndrome de Wernicke-Korsakoff é exacerbada por um defeito na transcetolase



A síndrome de Wernicke-Korsakoff é um distúrbio causado por uma deficiência grave de tiamina, componente da TPP. A síndrome é mais comum entre alcoólatras do que na população em geral, uma vez que o consumo crônico e intenso de álcool interfere com a absorção intestinal de tiamina. A síndrome pode ser exacerbada por uma mutação no gene da transcetolase que resulta em uma enzima com baixa afinidade por TPP – uma afinidade dez vezes menor que a normal. Esse defeito torna os indivíduos muito mais sensíveis à deficiência de tiamina: mesmo uma deficiência moderada de tiamina (tolerável por indivíduos com transcetolase não mutada) faz o nível de TPP cair abaixo daquele necessário para saturar a enzima mutada. O resultado é uma redução da velocidade de toda a via das pentoses-fosfato. Em pessoas com a síndrome de Wernicke-Korsakoff isso resulta no agravamento dos sintomas, que podem incluir perda grave da memória, confusão mental e paralisia parcial. ■

(a) Transcetolase



(b) Transaldolase

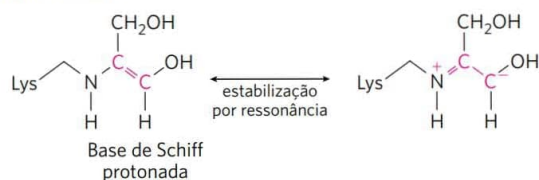


FIGURA 14-27 Intermediários carbânions estabilizados por interações covalentes com a transcetolase e a transaldolase. (a) O anel da TPP estabiliza o carbânion no grupo di-hidroxietila transportado pela transcetolase; ver Figura 14-15 para a química da ação da TPP. (b) Na reação da transaldolase, a base de Schiff protonada formada entre o grupo ϵ -amino da cadeia lateral de uma Lys e o substrato estabiliza o carbânion C-3 formado após a clivagem aldólica.

A glicose-6-fosfato é repartida entre a glicólise e a via das pentoses-fosfato

A entrada da glicose-6-fosfato na glicólise ou na via das pentoses-fosfato depende das necessidades momentâneas da

célula e da concentração de NADP^+ no citosol. Na ausência deste aceptor de elétrons, a primeira reação da via das pentoses-fosfato (catalisada pela G6PD) não pode prosseguir. Quando a célula está convertendo rapidamente NADPH em NADP^+ em reduções biossintéticas, o nível de NADP^+ eleva-se, estimulando alotericamente a G6PD e, dessa forma, aumentando o fluxo de glicose-6-fosfato pela via das pentoses-fosfato (**Figura 14-28**). Quando a demanda por NADPH é menor, o nível de NADP^+ diminui, a velocidade da via das pentoses-fosfato também diminui e a glicose-6-fosfato é usada para alimentar a glicólise.

RESUMO 14.5 Oxidação da glicose pela via das pentoses-fosfato

- A parte *oxidativa* da via das pentoses-fosfato (via do fosfogliconato ou via das hexoses-monofosfato) realiza a oxidação e a descarboxilação da glicose-6-fosfato no C-1, reduzindo o NADP^+ em NADPH e produzindo pentoses-fosfato.
- O NADPH fornece a força redutora para reações biossintéticas, e a ribose-5-fosfato é um precursor para a síntese de nucleotídeos e ácidos nucleicos. Tecidos em crescimento rápido e tecidos realizando biossíntese ativa de ácidos graxos, colesterol ou hormônios esteroides enviam mais glicose-6-fosfato para a via das pentoses-fosfato do que os tecidos com menor demanda por pentoses-fosfato e poder redutor.
- A primeira fase da via das pentoses-fosfato consiste em duas oxidações, que convertem glicose-6-fosfato em ribulose-5-fosfato e reduzem NADP^+ a NADPH . A segunda fase compreende etapas não oxidativas que convertem pentoses-fosfato em glicose-6-fosfato, que inicia o ciclo novamente.

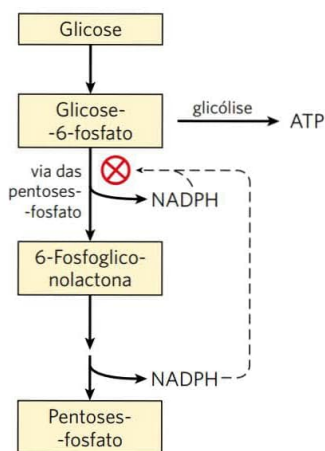


FIGURA 14-28 Papel do NADPH na regulação da partilha da glicose-6-fosfato entre a glicólise e a via das pentoses-fosfato. Quando NADPH é formado mais rápido do que está sendo consumido para as vias de biossíntese e para a redução da glutatona (ver Figura 14-21), a $[\text{NADPH}]$ aumenta e inibe a primeira enzima da via das pentoses-fosfato. Como resultado, mais glicose-6-fosfato está disponível para a glicólise.

- Na segunda fase, a transcetolase (com TPP como cofator) e a transaldolase catalisam a interconversão de açúcares de três, quatro, cinco, seis e sete átomos de carbono, com a conversão reversível de seis pentoses-fosfato em cinco hexoses-fosfato. Nas reações de fixação de carbono da fotossíntese, as mesmas enzimas catalisam o processo inverso, a via *redutora* das pentoses-fosfato: a conversão de cinco hexoses-fosfato em seis pentoses-fosfato.
- Um defeito genético da transcetolase que provoca a diminuição da sua afinidade por TPP agrava a síndrome de Wernicke-Korsakoff.
- A entrada de glicose-6-fosfato na via glicolítica ou na via das pentoses-fosfato é basicamente determinada pelas concentrações relativas de NADP^+ e NADPH .

Termos-chave

Termos em negrito estão definidos no glossário.

glicólise 534	glicólise aeróbica 545
fermentação 534	mutases 549
fermentação láctica 537	isomerases 549
hipoxia 536	intolerância à lactose 551
fermentação etanólica (alcoólica) 537	galactosemia 551
isoenzimas 538	tiamina-pirofosfato (TPP) 555
acil-fosfato 541	gliconeogênese 558
fosforilação no nível do substrato 543	biotina 560
fosforilação ligada à respiração 543	via das pentoses-fosfato 565
fosfoenolpiruvato (PEP) 544	via do fosfogliconato 565
	via das hexoses-monofosfato 565

Teste seu conhecimento

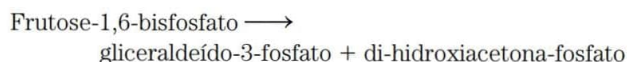
1. Equação para a fase preparatória da glicólise Escreva equações bioquímicas equilibradas para todas as reações do catabolismo da glicose em duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato (a fase preparatória da glicólise), incluindo a variação de energia livre padrão para cada reação. Depois escreva a equação global ou líquida para a fase preparatória da glicólise, com a variação de energia livre padrão líquida.

2. Fase de pagamento da glicólise em músculo esquelético No músculo esquelético em atividade, sob condições anaeróbicas, o gliceraldeído-3-fosfato é convertido em piruvato (a fase de pagamento da glicólise), o qual é reduzido a lactato. Escreva as equações equilibradas para todas as reações desse processo, com a variação de energia livre padrão para cada reação. Depois escreva a equação global ou líquida para a fase de pagamento da glicólise (com o lactato como produto final), incluindo a variação de energia livre padrão líquida.

3. Os transportadores GLUT Compare a localização de GLUT4 com a de GLUT2 e GLUT3, e explique por que essas localizações são importantes na resposta do músculo, do tecido adiposo, do encéfalo e do fígado à insulina.

4. Produção de etanol em leveduras As leveduras (*S. cerevisiae*), quando crescem anaerobicamente em meio com glicose, convertem piruvato a acetaldeído e, então, reduzem o acetaldeído a etanol usando elétrons do NADH. Escreva a equação para a segunda reação e calcule sua constante de equilíbrio a 25°C, utilizando os potenciais de redução padrão que estão na Tabela 13-7.

5. Variações energéticas da reação da aldolase A aldolase catalisa a reação glicolítica



A variação de energia livre padrão para esta reação no sentido descrito é + 23,8 kJ/mol. As concentrações dos três intermediários no hepatócito de mamíferos são: frutose-1,6-bisfosfato, $1,4 \times 10^{-5}$ M; gliceraldeído-3-fosfato, 3×10^{-6} M; e di-hidroxiacetona-fosfato, $1,6 \times 10^{-5}$ M. À temperatura corporal (37°C), qual a variação real para a energia livre para esta reação?

6. O caminho dos átomos na fermentação Um experimento de “pulso e busca” usando fontes de carbono marcadas com ^{14}C é realizado em extrato de levedura mantida em condições rigorosas de anaerobiose para produzir etanol. O experimento consiste na incubação de pequena quantidade do substrato marcado com ^{14}C (o pulso) com o extrato de levedura, apenas o tempo necessário para cada intermediário da via de fermentação tornar-se marcado. A marcação é, então, “buscada” ao longo da via pela adição de excesso de glicose não marcada. A busca impede efetivamente qualquer entrada adicional de glicose marcada na via.

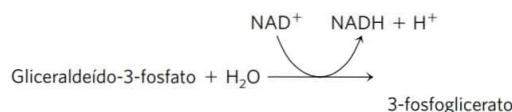
- Se $[1-^{14}\text{C}]$ glicose (glicose marcada no C-1 com ^{14}C) é utilizada como substrato, qual é a localização do ^{14}C no etanol produzido? Explique.
- Onde teria que estar localizado o ^{14}C na glicose inicial para assegurar que toda atividade do ^{14}C seja liberada como $^{14}\text{CO}_2$ durante a fermentação a etanol? Explique.

7. O calor das fermentações Os fermentadores industriais de larga escala geralmente necessitam resfriamento constante e eficaz. Por quê?

8. A fermentação para a produção de molho de soja O molho de soja é preparado por fermentação de uma mistura salgada de feijão de soja e trigo com vários microrganismos, incluindo leveduras, ao longo de um período de 8 a 12 meses. O molho resultante (depois da remoção dos sólidos) é rico em lactato e etanol. Como esses dois compostos são produzidos? Para evitar que o molho de soja tenha um gosto forte de vinagre (vinagre é ácido acético diluído), o oxigênio deve ser mantido fora do tanque de fermentação. Por quê?

9. Equivalência das trioses-fosfato Gliceraldeído-3-fosfato marcado com ^{14}C foi adicionado a um extrato de levedura. Após um curto período de tempo, foi isolada frutose-1,6-bisfosfato marcada com ^{14}C no C-3 e no C-4. Qual era a localização do ^{14}C no gliceraldeído-3-fosfato inicial? De onde veio a segunda marcação com ^{14}C na frutose-1,6-bisfosfato? Explique.

10. Atalho da glicólise Suponha que você descobriu uma levedura mutante cuja via glicolítica foi encurtada devido à presença de uma nova enzima que catalisa a reação



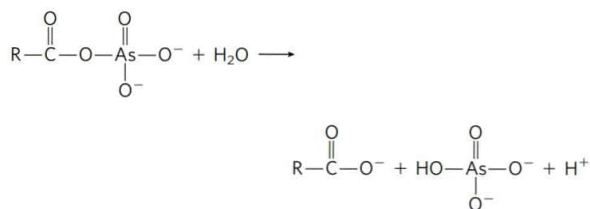
O encurtamento resultante da via glicolítica beneficiaria a célula? Explique.

11. Papel da lactato-desidrogenase Durante atividade intensa, a demanda por ATP no tecido muscular aumenta muito. Nos músculos das pernas do coelho ou no músculo das asas do peru, o ATP é produzido quase exclusivamente por fermentação láctica. O ATP é formado na fase de pagamento da glicólise por meio de duas reações, promovidas pela fosfoglicerato-cinase e pela piruvato-cinase. Suponha que o músculo esquelético seja desprovido da lactato-desidrogenase. Poderia ele desenvolver atividade física vigorosa, ou seja, gerar ATP em alta taxa pela glicólise? Explique.

12. Eficiência da produção de ATP no músculo A transformação de glicose em lactato nos miócitos libera apenas em torno de 7% da energia livre liberada quando a glicose é completamente oxidada a CO_2 e H_2O . Isso significa que a glicólise anaeróbica no músculo é um desperdício de glicose? Explique.

13. Variação da energia livre para a oxidação das trioses-fosfato A oxidação do gliceraldeído-3-fosfato a 1,3-bisfosfoglicerato, catalisada pela gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, ocorre com uma constante de equilíbrio desfavorável ($K'_{\text{eq}} = 0,08$; $\Delta G'^{\circ} = 6,3$ kJ/mol), mas o fluxo por esse ponto da via glicolítica ocorre facilmente. Como a célula supera o equilíbrio desfavorável?

14. Envenenamento por arsenato A arsenato é estrutural e quimicamente semelhante ao fosfato inorgânico (P_i), e muitas enzimas que necessitam de fosfato também usariam o arsenato. No entanto, os compostos orgânicos de arsenato são menos estáveis do que os compostos de fosfato análogos. Por exemplo, acil-arsenatos se decompõem rapidamente por hidrólise:



Por outro lado, acil-fosfatos, como o 1,3-bisfosfoglicerato, são mais estáveis e podem ser adicionalmente transformados nas células por meio de ação enzimática.

- Antecipe o efeito na reação líquida catalisada pela gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase se o fosfato fosse substituído por arsenato.
- Qual seria a consequência para um organismo se o fosfato fosse substituído por arsenato? O arsenato é muito tóxico para a maioria dos organismos. Explique por quê.

15. Necessidade de fosfato para a fermentação alcoólica Em 1906, Harden e Young, em uma série de estudos clássicos sobre a fermentação da glicose a etanol e CO_2 por extratos de leveduras de cerveja, fizeram as seguintes observações: (1) o fosfato inorgânico foi essencial para a fermentação; quando o supri-

mento de fosfato esgotava, a fermentação parava antes que toda a glicose fosse utilizada. (2) Durante a fermentação nessas condições, havia acúmulo de etanol, CO_2 e uma hexose-bisfosfato. (3) Quando o fosfato era substituído por arsenato, a hexose-bisfosfato não se acumulava, mas a fermentação ocorria até que toda glicose fosse convertida em etanol e CO_2 .

- (a) Por que a fermentação cessa quando o suprimento de fosfato se esgota?
- (b) Por que etanol e CO_2 se acumulam? A conversão de piruvato a etanol e CO_2 é essencial? Por quê? Identifique a hexose-bisfosfato que se acumula. Por que ela se acumula?
- (c) Por que a substituição de fosfato por arsenato previne o acúmulo da hexose-bisfosfato, mas permite que a fermentação a etanol e CO_2 se complete? (ver Problema 14.)

16. Papel da vitamina niacina Adultos engajados em exercício físico intenso necessitam, para nutrição adequada, uma ingestão de cerca de 160 g de carboidrato diariamente, mas apenas em torno de 20 mg de niacina. Dado o papel da niacina na glicólise, como você explica essa observação?

17. Síntese do glicerol-fosfato O glicerol-3-fosfato necessário para a síntese de glicerofosfolípidos pode ser sintetizado a partir de um intermediário glicolítico. Proponha uma sequência de reações para essa conversão.

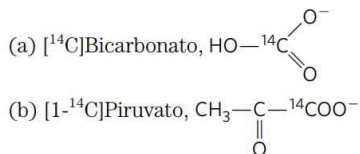


18. Gravidade dos sintomas clínicos devido à deficiência de enzimas

Os sintomas clínicos de duas formas de galactosemia – deficiência de galactocinase ou de UDP-glicose:galactose-1-fosfato-uridiltransferase – mostram gravidade radicalmente diferente. Embora os dois tipos provoquem desconforto gástrico após a ingestão de leite, a deficiência da transferase também leva a disfunções do fígado, dos rins, do baço, do encéfalo e, por fim, à morte. Quais produtos se acumulam no sangue e nos tecidos em cada tipo de deficiência enzimática? Estime as toxicidades relativas desses produtos a partir da informação acima.

19. Definhamo dos músculos durante o jejum prolongado Uma consequência do jejum prolongado é a redução da massa muscular. O que acontece com as proteínas musculares?

20. A via dos átomos na gliconeogênese Um extrato de fígado capaz de realizar todas as reações metabólicas normais do fígado é incubado por um curto período, em experimentos distintos, com os seguintes precursores marcados com ^{14}C .



Trace a via de cada precursor ao longo da gliconeogênese. Indique a localização do ^{14}C em todos os intermediários e no produto, a glicose.

21. Custo energético de um ciclo de glicólise e gliconeogênese Qual é o custo (em equivalentes de ATP) de transformar glicose em piruvato pela via glicolítica e de este voltar à glicose pela gliconeogênese?

22. Relação entre gliconeogênese e glicólise Por que é importante que a gliconeogênese não seja o inverso exato da glicólise?

23. Variações energéticas da reação da piruvato-cinase Explique em termos bioenergéticos como a conversão de piruvato em fosfoenolpiruvato na gliconeogênese supera a grande variação negativa da energia livre padrão da reação da piruvato-cinase na glicólise.

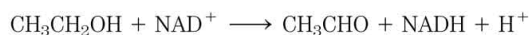
24. Substratos glicogênicos Um procedimento comum para determinar a eficiência de um composto como precursor de glicose em mamíferos é manter um animal em jejum até que os estoques de glicogênio do fígado sejam consumidos e, então, administrar o composto em questão. O substrato que levar a um aumento líquido do glicogênio hepático é chamado de glicogênico, uma vez que ele deve ser primeiro convertido em glicose-6-fosfato. Mostre por meio de reações enzimáticas conhecidas quais dos substratos a seguir são glicogênicos.

- (a) Succinato, $^- \text{OOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}^-$
- (b) Glicerol, $\begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{OH} \quad \text{OH} \\ | \quad | \quad | \\ \text{CH}_2-\text{C}-\text{CH}_2 \\ | \\ \text{H} \end{array}$
- (c) Acetil-CoA, $\begin{array}{c} \text{O} \\ || \\ \text{CH}_3-\text{C}-\text{S-CoA} \end{array}$
- (d) Piruvato, $\begin{array}{c} \text{O} \\ || \\ \text{CH}_3-\text{C}-\text{COO}^- \end{array}$
- (e) Butirato, $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}^-$



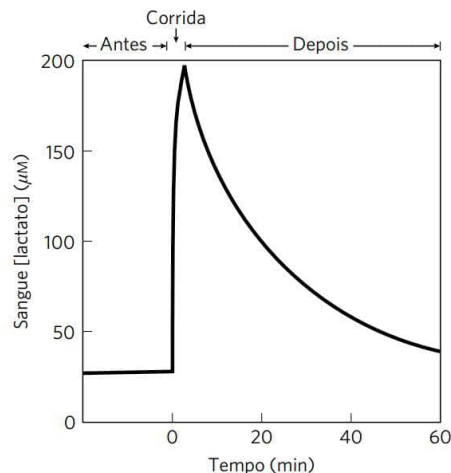
25. O etanol afeta os níveis de glicose no sangue

O consumo de álcool (etanol), principalmente após períodos de atividade intensa ou depois de várias horas sem comer, resulta em uma deficiência de glicose no sangue, uma condição conhecida como hipoglicemia. A primeira etapa no metabolismo do etanol pelo fígado é a oxidação a acetaldeído, catalisada pela álcool-desidrogenase hepática:



Explique como essa reação inibe a transformação de lactato em piruvato. Por que isso leva à hipoglicemia?

26. Níveis de lactato no sangue durante exercício intenso As concentrações de lactato no plasma sanguíneo antes, durante e depois de uma corrida de 400 m estão mostradas no gráfico.

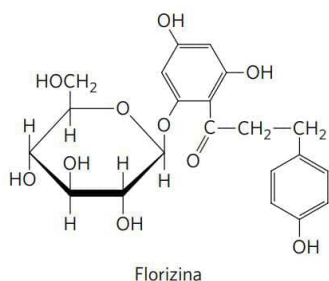


- (a) O que causa o rápido aumento na concentração de lactato?
 (b) O que causa o declínio da concentração de lactato após o término da corrida? Por que o declínio ocorre mais lentamente do que o aumento?
 (c) Por que a concentração de lactato não é zero durante o estado de repouso?



27. Relação entre frutose-1,6-bisfosfato e os níveis de lactato no sangue Um defeito congênito na enzima hepática frutose-1,6-bisfosfatase resulta em níveis de lactato anormalmente altos no plasma sanguíneo. Explique.

28. Efeito da florizina no metabolismo dos carboidratos A florizina, um glicosídeo tóxico da casca da pereira, bloqueia a reabsorção normal de glicose no túbulo renal, fazendo a glicose presente no sangue ser quase completamente excretada na urina. Em um experimento, ratos alimentados com florizina e succinato de sódio excretaram cerca de 0,5 mol de glicose (sintetizada pela gliconeogênese) para cada 1 mol de succinato de sódio ingerido. Como o succinato é transformado em glicose? Explique a estequiometria.



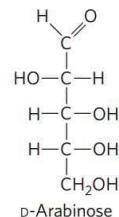
29. Excesso de captação de oxigênio durante a gliconeogênese O lactato absorvido pelo fígado é convertido em glicose, com o consumo de 6 moles de ATP por mol de glicose produzida. A extensão desse processo em uma preparação de fígado de rato pode ser monitorada pela administração de $[^{14}\text{C}]$ lactato e pela medida da quantidade de $[^{14}\text{C}]$ glicose produzida. Como a estequiometria entre o consumo de O_2 e a produção de ATP é conhecida (cerca de 5 ATP por O_2), pode-se prever o consumo extra de O_2 , acima da velocidade normal, quando uma dada quantidade de lactato é administrada. No entanto, quando o O_2 extra utilizado na síntese de glicose a partir de lactato é efetivamente medido, é sempre maior que o predito pela relação estequiométrica conhecida. Sugira uma explicação possível para essa observação.

30. Papel da via das pentoses-fosfato Se a oxidação da glicose-6-fosfato pela via das pentoses-fosfato estivesse sendo utilizada para gerar principalmente NADPH para reações de biossíntese, o outro produto, ribose-5-fosfato, se acumularia. Que problemas isso poderia causar?

Problema de análise de dados

31. Criando um sistema de fermentação A fermentação de matéria vegetal para a produção de etanol combustível é um método potencial para reduzir o uso de combustíveis fósseis e, assim, as emissões de CO_2 que levam ao aquecimento global. Muitos microrganismos podem degradar celulose e, então, fermentar a glicose a etanol. No entanto, muitas fontes potenciais de celulose, incluindo resíduos da agricultura e *switchgrass* (*Panicum virgatum*, gramínea perene nativa da América do

Norte), também contêm quantidades substanciais de arabinose, que não é tão facilmente fermentada.



A *Escherichia coli* é capaz de fermentar arabinose a etanol, mas a bactéria não é naturalmente tolerante a altos níveis de etanol, limitando, dessa forma, sua utilidade para a produção de etanol comercial. Outra bactéria, *Zymomonas mobilis*, é naturalmente tolerante a altos níveis de etanol, mas não pode fermentar arabinose. Deanda, Zhang, Eddy e Picataggio (1996) descreveram seus esforços para combinar as principais características úteis desses dois organismos, introduzindo os genes das enzimas metabolizadoras de arabinose de *E. coli* em *Z. mobilis*.

- (a) Por que essa é uma estratégia mais simples que o inverso: criar *E. coli* mais tolerante a etanol?

Deanda e colaboradores inseriram cinco genes de *E. coli* no genoma de *Z. mobilis*: *araA*, que codifica L-arabinose-isomerase, a qual interconverte L-arabinose em L-ribulose; *araB*, L-ribulocinase, que usa ATP para fosforilar L-ribulose em C-5; *araD*, L-ribulose-5-fosfato-epimerase, que interconverte L-ribulose-5-fosfato em L-xilulose-5-fosfato; *talB*, transaldolase; e *tktA*, transcetolase.

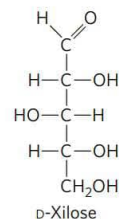
- (b) Descreva brevemente a transformação química catalisada por cada uma das três enzimas *ara* e, quando possível, indique uma enzima discutida neste capítulo que realize uma reação análoga.

Os cinco genes de *E. coli* inseridos em *Z. mobilis* permitiram a entrada da arabinose na fase não oxidativa da via das pentoses-fosfato (Figura 14-23), na qual ela foi convertida em glicose-6-fosfato e fermentada a etanol.

- (c) As três enzimas *ara* eventualmente convertem a arabinose em que açúcar?
 (d) O produto da parte (c) alimenta a via mostrada na Figura 14-23. Combinando as cinco enzimas de *E. coli* listadas acima com as enzimas dessa via, descreva a via global para a fermentação de seis moléculas de arabinose a etanol.
 (e) Qual é a estequiometria da fermentação de seis moléculas de arabinose a etanol e CO_2 ? Quantas moléculas de ATP você esperaria que essa reação gerasse?

- (f) *Zymomonas mobilis* utiliza uma via para a fermentação etanólica levemente diferente daquela descrita neste capítulo. Como resultado, o rendimento de ATP esperado é apenas 1 ATP por molécula de arabinose. Apesar de isso ser menos benéfico para a bactéria, é melhor para a produção de etanol. Por quê?

Outro açúcar comumente encontrado em material vegetal é a xilose.



- (g) Quais enzimas adicionais você precisaria introduzir na linhagem de *Z. mobilis* modificada, descrita anteriormente, para capacitá-la a usar xilose assim como arabinose para produzir etanol? Você não precisa nomear as enzimas (elas nem mesmo precisam existir); apenas cite as reações que elas precisariam catalisar.

Referência

Deanda, K., M. Zhang, C. Eddy e S. Picataggio. 1996. Development of an arabinose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain by metabolic pathway engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:4465–4470.

Princípios da regulação metabólica

- 15.1 Regulação das vias metabólicas 575
- 15.2 Análise do controle metabólico 584
- 15.3 Regulação coordenada da glicólise e da gliconeogênese 589
- 15.4 Metabolismo do glicogênio nos animais 600
- 15.5 Regulação coordenada da síntese e da degradação do glicogênio 608

A regulação metabólica, tema central em bioquímica, é um dos aspectos mais marcantes dos organismos vivos. Entre as milhares de reações catalisadas por enzimas que ocorrem nas células, é provável que não exista uma sequer que escape de alguma forma de regulação. Essa necessidade de regular cada aspecto do metabolismo celular se torna clara quando se examina a complexidade das sequências de reações metabólicas. Embora para o estudante de bioquímica seja conveniente dividir os processos metabólicos em “vias” que desempenham papéis distintos na economia celular, essa separação não existe na célula viva. Ao contrário, cada via discutida neste livro está indissociavelmente entrelaçada em uma rede multidimensional de reações com todas as outras vias celulares (**Figura 15-1**). Por exemplo, no Capítulo 14, foram discutidos quatro destinos possíveis para a **glicose-6-fosfato** em um hepatócito: degradação pela glicólise para a produção de ATP, degradação na via das pentoses-fosfato para a produção de NADPH e pentoses-fosfato, utilização na síntese de polissacarídeos complexos da matriz extracelular, ou hidrólise em glicose e fosfato para repor a glicose sanguínea. Na verdade, a glicose-6-fosfato também tem outros destinos possíveis nos hepatócitos; ela pode, por exemplo, ser usada para a síntese de outros açúcares, como glicosamina, galactose, galactosamina, fucose e ácido neurâmico, na glicosilação de proteínas, ou pode ser parcialmente degradada para fornecer acetil-CoA para a síntese de ácidos graxos e esteróis. Já a bactéria *Escherichia coli* pode usar a glicose para produzir o esqueleto carbonado de *cada um* dos seus vários milhares de tipos de moléculas. Quando uma célula qualquer utiliza a glicose-6-fosfato para um propósito, essa “decisão” afeta todas as outras vias nas quais esse açúcar é precursor ou intermediário: qualquer mudança na distribuição da glicose-6-fosfato para uma via afeta, direta ou indiretamente, o fluxo de metabólitos por todas as outras.

Essas mudanças na distribuição são comuns na vida das células. Louis Pasteur foi o primeiro a descrever o aumento

de mais de 10 vezes no consumo de glicose em uma cultura de leveduras quando a cultura foi transferida da condição aeróbica para a anaeróbica. Esse “efeito Pasteur” ocorre sem mudança significativa nas concentrações de ATP ou da maioria das centenas de intermediários metabólicos e produtos derivados da glicose. Ocorre efeito semelhante nas células do músculo esquelético quando um atleta que corre 100 m rasos dispara na linha de largada. A capacidade da célula de executar simultaneamente todos esses processos metabólicos conectados – obter cada produto na quantidade necessária e no tempo certo, diante de grandes perturbações do meio externo e sem gerar sobras – é uma realização *impressionante*.

Este capítulo utiliza o metabolismo da glicose para ilustrar alguns princípios gerais da regulação metabólica. Primeiro, serão abordadas as funções gerais da regulação na manutenção da homeostasia metabólica e será apresentada a análise do controle metabólico, um sistema de análise quantitativa de interações metabólicas complexas. Serão descritas as propriedades reguladoras específicas das enzimas do metabolismo da glicose; para a glicólise e a gliconeogênese, serão descritas as atividades catalíticas das enzimas já estudadas no Capítulo 14. Também serão discutidas as propriedades catalíticas e reguladoras das enzimas da síntese e da degradação do glicogênio, um dos casos mais bem estudados de regulação metabólica. Observe que, ao selecionar o metabolismo de carboidratos para ilustrar os princípios da regulação metabólica, foi separado artificialmente o metabolismo das gorduras e o dos carboidratos. Na verdade, essas duas atividades estão firmemente integradas, como será visto no Capítulo 23.

15.1 Regulação das vias metabólicas

As vias do metabolismo da glicose fornecem, no sentido catabólico, a energia essencial para se opor às forças de entropia e, no sentido anabólico, precursores biossintéticos e uma forma de armazenamento da energia metabólica. Essas reações são tão importantes para a sobrevivência que mecanismos reguladores muito complexos evoluíram para assegurar que os metabólitos se desloquem ao longo de cada via no sentido e na velocidade corretos para satisfazer exatamente as condições variáveis da célula ou do organismo. Quando as condições externas se alteram, são feitos ajustes na velocidade do fluxo metabólico ao longo de toda uma via por uma grande variedade de mecanismos que operam em escalas de tempo diferentes.

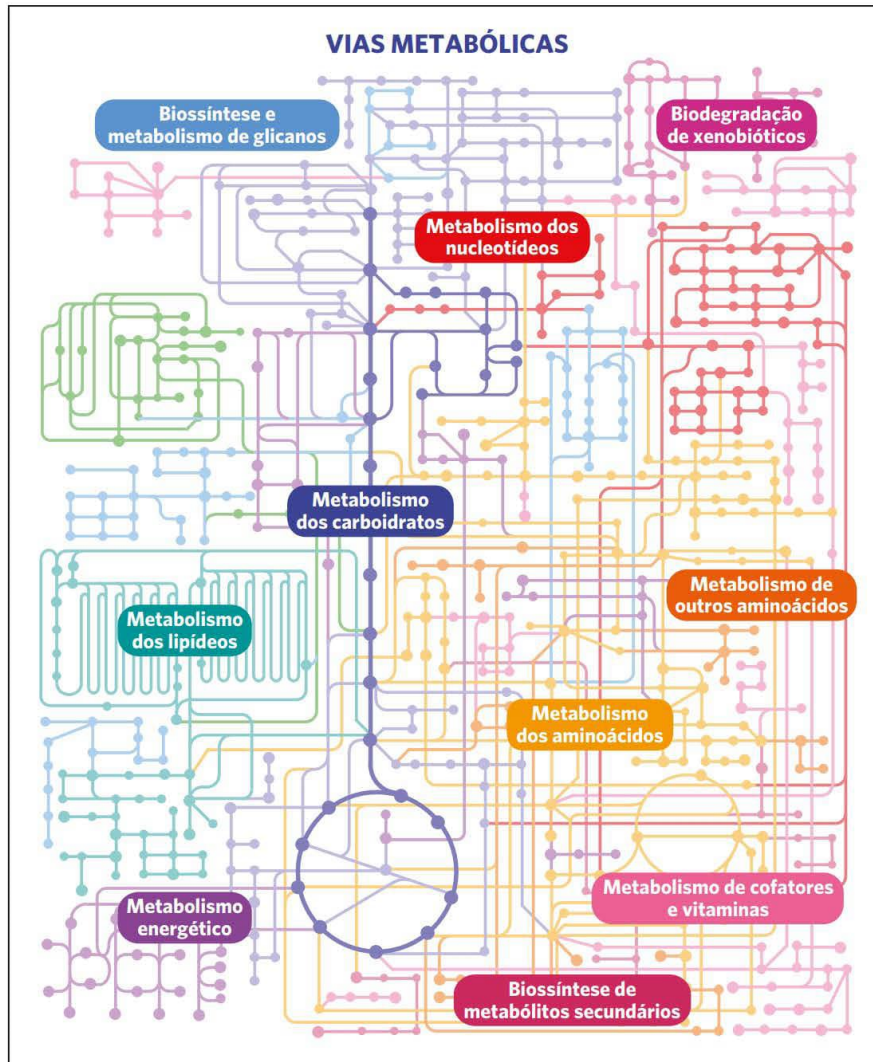


FIGURA 15-1 O metabolismo como malha tridimensional. Uma típica célula eucariótica tem a capacidade de produzir cerca de 30 mil proteínas diferentes, que catalisam milhares de reações diferentes envolvendo muitas centenas de metabólitos, muitos deles compartilhados por mais de uma “via”. Nesta visão geral e muito simplificada das vias metabólicas, cada ponto representa um composto intermediário e cada linha de conexão representa uma reação enzimática. Consulte, no banco de dados KEGG PATHWAY (www.genome.ad.jp/kegg/pathway/map/map01100.html), um diagrama mais realista e muito mais complexo do metabolismo. Neste mapa interativo, cada ponto pode ser acionado para se obter dados adicionais sobre o composto e as enzimas das quais ele é substrato. [Fonte: www.genome.ad.jp/kegg/pathway/map/map01100.html.]

As condições mudam, às vezes, de forma drástica. Por exemplo, a demanda por ATP nos músculos de voo dos insetos aumenta 100 vezes em poucos segundos quando o inseto alça voo. Nos seres humanos, a disponibilidade de oxigênio pode ser reduzida devido à hipoxia (redução da liberação de oxigênio aos tecidos) ou à isquemia (redução do fluxo sanguíneo para os tecidos). A cicatrização de ferimentos exige quantidades muito grandes de energia e de precursores biossintéticos. As proporções relativas de carboidrato, gordura e proteína na dieta variam de acordo com a refeição, e o suprimento de combustíveis obtido na dieta é intermitente, o que exige ajustes metabólicos entre as refeições e durante períodos de jejum.

As células e os organismos mantêm um estado estacionário dinâmico

Combustíveis como glicose entram na célula, e resíduos como o CO_2 saem dela, mas a massa e a composição total de uma célula típica, de um órgão ou de um animal adulto não se alteram de modo significativo ao longo do tempo; as células e os organismos existem em um estado estacionário dinâmico. Para cada reação metabólica em uma via, o substrato é fornecido pela reação precedente na mesma velocidade na qual é convertido em produto. Assim, apesar de a velocidade (v) da vazão metabólica, ou **fluxo**, por essa etapa da via poder ser alta e variável, a concentração

do substrato, S, permanece constante. Assim, para a reação em duas etapas



quando $v_1 = v_2$, [S] é constante. Por exemplo, alterações na v_1 da entrada da glicose no sangue a partir de várias fontes são equilibradas por alterações na v_2 da captação da glicose por vários tecidos a partir do sangue, de forma que a concentração do açúcar no sangue ([S]) se mantém quase constante em 5 mM. Isto é **homeostasia** no nível molecular. Falhas nos mecanismos homeostáticos são frequentemente a causa de doenças humanas. No diabetes melito, por exemplo, a regulação da concentração sanguínea da glicose é deficiente como resultado da falta ou da insensibilidade à insulina, com consequências clínicas profundas.

Quando a perturbação externa não é meramente transitória, ou quando um tipo de célula se transforma em outro, os ajustes na composição celular e no metabolismo podem ser mais drásticos e requererem mudanças permanentes e significativas na alocação de energia e de precursores sintéticos para alcançar um novo estado estacionário dinâmico. Considere, por exemplo, a diferenciação de células-tronco em eritrócitos na medula óssea. A célula precursora contém um núcleo, mitocôndrias, além de pouca ou nenhuma hemoglobina, ao passo que o eritrócito totalmente diferenciado contém uma grande quantidade de hemoglobina, mas não tem núcleo nem mitocôndrias; a composição celular mudou permanentemente em resposta aos sinais externos de desenvolvimento, que acompanham as mudanças no metabolismo. Essa **diferenciação celular** requer uma regulação precisa dos níveis de cada proteína da célula.

Ao longo da evolução, os organismos adquiriram uma coleção admirável de mecanismos reguladores para a manutenção da homeostasia nos níveis molecular, celular e de organismo, o que se reflete na proporção de genes que codificam a maquinaria reguladora. Nos seres humanos, cerca de 2.500 genes (~ 12% de todos os genes) codificam proteínas reguladoras, incluindo uma grande variedade de receptores, de reguladores da expressão gênica e mais de 800 proteínas-quinase diferentes. Em muitos casos, os mecanismos reguladores se sobrepõem: uma enzima pode estar sujeita à regulação por vários mecanismos diferentes.

A quantidade de uma enzima e sua atividade catalítica podem ser reguladas

O fluxo de uma reação catalisada por uma enzima pode ser modulado por alterações no *número* de moléculas da enzima ou por alterações na *atividade catalítica* de cada uma das moléculas enzimáticas já presentes. Essas alterações ocorrem em uma escala de tempo de milissegundos até muitas horas, em resposta a sinais de dentro ou de fora da célula. Mudanças alostéricas muito rápidas na atividade enzimática em geral são desencadeadas localmente, por alterações na concentração local de uma molécula pequena – um substrato da via na qual essa reação é uma das etapas (p. ex., glicose na glicólise), um produto da via (ATP da glicólise)

ou um metabólito-chave ou cofator (como o NADH) que indica o estado metabólico da célula. Segundos mensageiros (como AMP cíclico e Ca^{2+}) gerados na porção intracelular em resposta a sinais extracelulares (hormônios, citocinas, e assim por diante) também controlam a regulação alostérica, em uma escala de tempo levemente mais lenta, determinada pela velocidade dos mecanismos de transdução de sinal (ver Capítulo 12).

Os sinais extracelulares (**Figura 15-2, 1**) podem ser hormonais (p. ex., insulina ou adrenalina) ou neuronais (acetilcolina), ou podem ser fatores de crescimento ou citocinas. O número de moléculas de determinada enzima em uma célula é função das taxas relativas de síntese e degradação dessa enzima. A taxa de síntese pode ser ajustada pela ativação (em resposta a alguns sinais externos) de um fator de transcrição (**Figura 15-2, 2**; descrito em mais detalhes no Capítulo 28). Os **fatores de transcrição** são proteínas nucleares que, quando ativadas, ligam-se a regiões específicas do DNA (**elementos de resposta**) próximas a um promotor gênico (ponto de início de transcrição do gene) e ativam ou reprimem a transcrição do gene, levando ao aumento ou à redução da síntese da proteína codificada. A ativação de um fator de transcrição às vezes resulta de sua interação com um ligante específico ou de sua fosforilação ou desfosforilação. Cada gene é controlado por um ou mais elementos de resposta reconhecidos por fatores de transcrição específicos. Os genes que têm vários elementos de resposta são então controlados por vários fatores de transcrição diferentes, respondendo a vários sinais diferentes. Grupos de genes que codificam proteínas que atuam em conjunto, como as enzimas da glicólise ou da gliconeogênese, frequentemente compartilham sequências de elementos de resposta comuns, de modo que um único sinal, agindo por meio de um determinado fator de transcrição, ativa ou reprime todos esses genes em conjunto. A regulação do metabolismo de carboidratos por fatores de transcrição específicos está descrita na Seção 15.3.

A estabilidade dos RNA mensageiros (mRNA), isto é, sua resistência à degradação por ribonucleases celulares (**Figura 15-2, 3**), varia, e a quantidade de um dado mRNA na célula é função de sua taxa de síntese e degradação (**Capítulo 26**). A velocidade na qual um mRNA é traduzido em proteína pelos ribossomos (**Figura 15-2, 4**) também é regulada e depende de vários fatores descritos em detalhes no Capítulo 27. Observe que um aumento de n vezes em um mRNA nem sempre significa um aumento de n vezes no seu produto proteico.

As moléculas proteicas, uma vez sintetizadas, têm um tempo de vida finito, que pode variar de alguns minutos até muitos dias (**Tabela 15-1**). A taxa de degradação proteica (**Figura 15-2, 5**) difere de uma proteína para outra e depende das condições da célula. Algumas proteínas são marcadas pela ligação covalente de ubiquitina para serem degradadas nos proteassomos, conforme será discutido no Capítulo 27 (p. ex., o caso da ciclina, na **Figura 12-35**). A **reciclagem** rápida (síntese seguida de degradação) é energeticamente dispendiosa, mas proteínas com meia-vida curta podem alcançar novos níveis de estado estacionário muito

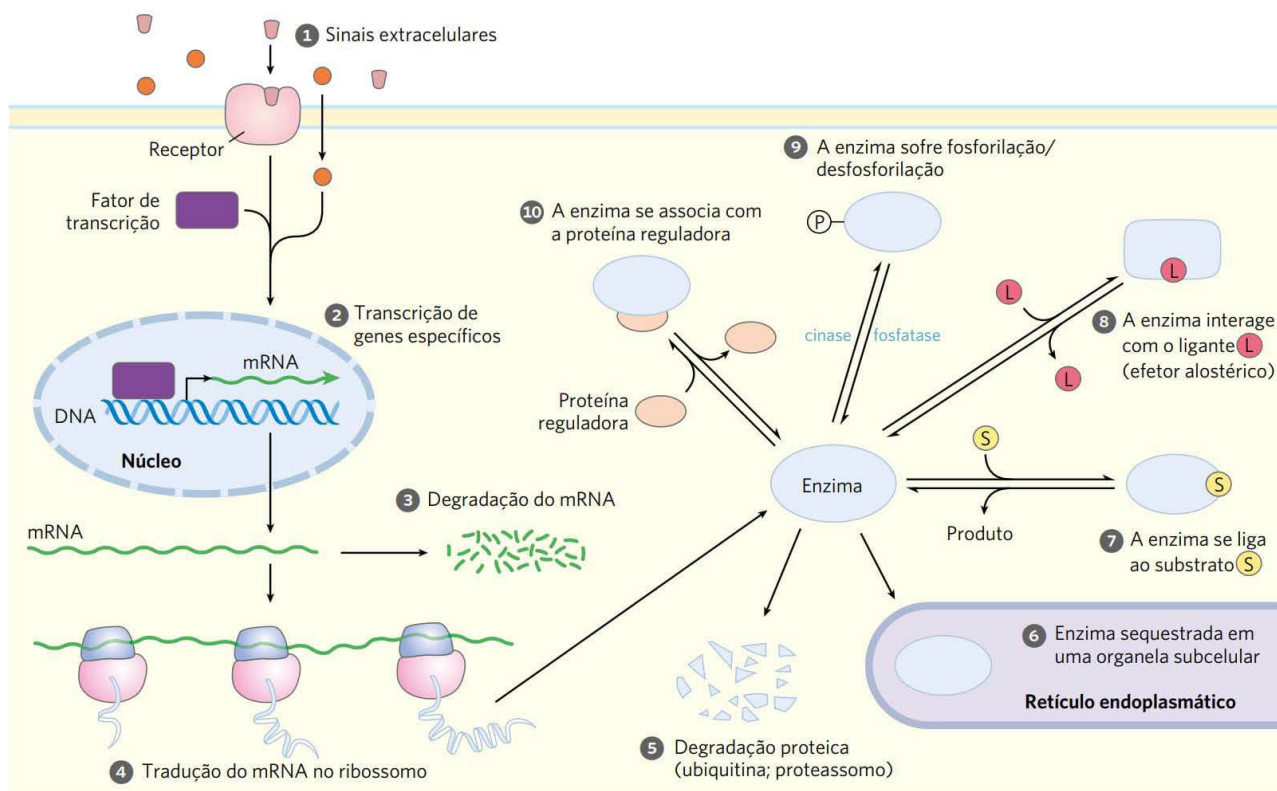


FIGURA 15-2 Fatores que afetam a atividade enzimática. A atividade total de uma enzima pode ser mudada pela alteração do número de suas moléculas na célula, ou sua atividade *efetiva* em um compartimento subcelular (1 a 6), ou pela modulação da *atividade* de moléculas já existentes (7 a 10), conforme está detalhado no texto. Uma enzima pode ser influenciada por uma combinação desses fatores.

mais rapidamente do que aquelas com meia-vida longa, e os benefícios dessa capacidade de resposta rápida devem equilibrar ou exceder o custo para a célula.

Outra maneira de alterar a atividade *efetiva* de uma enzima é sequestrá-la e a seu substrato em compartimentos diferentes (Figura 15-2, 6). No músculo, por exemplo, a hexocinase só pode agir sobre a glicose quando esta entra no miócito vinda do sangue, e a taxa de entrada depende da atividade dos transportadores de glicose (ver Tabela 11-3) na membrana plasmática. Dentro da célula, os compartimentos envoltos por membranas segregam determinadas

enzimas e sistemas enzimáticos, e o fator limitante da ação enzimática pode ser o transporte do substrato através dessas membranas intracelulares.

Por esses vários mecanismos de regulação do nível enzimático, as células podem alterar significativamente a quantidade total de suas enzimas em resposta a mudanças nas condições metabólicas. Nos vertebrados, o fígado é o tecido mais adaptável; por exemplo, a mudança de uma dieta rica em carboidratos para uma rica em lipídeos afeta a transcrição de centenas de genes e, conseqüentemente, os níveis de centenas de proteínas. Essas alterações totais na expressão gênica podem ser quantificadas pelo uso de microarranjos de DNA (ver Figura 9-23), que revelam a quantidade total de mRNA presente em certo tipo celular ou órgão (o **transcriptoma**), ou por eletroforese bidimensional (ver Figura 3-21), que mostra a totalidade de proteínas de um tipo celular ou de um órgão (seu **proteoma**). Ambas as técnicas proporcionam grande compreensão da regulação metabólica. O efeito das alterações no proteoma é, com frequência, uma mudança no conjunto de metabólitos de baixa massa molecular, o **metaboloma** (Figura 15-3). O metaboloma de *E. coli* crescendo em meio com glicose é dominado por poucas classes de metabólitos: glutamato (49%); nucleotídeos (principalmente ribonucleosídeos trifosfatados) (15%); intermediários da glicólise, do ciclo do ácido cítrico

TABELA 15-1 Meia-vida média das proteínas nos tecidos de mamíferos

Tecido	Meia-vida média (dias)
Fígado	0,9
Rim	1,7
Coração	4,1
Encéfalo	4,6
Músculo	10,7

e da via das pentoses-fosfato (vias centrais do metabolismo do carbono) (15%); e glutatona e cofatores *redox* (9%).

Logo que os mecanismos reguladores que envolvem a síntese e a degradação de proteínas produzem um determinado número de moléculas de cada enzima na célula, a atividade dessas enzimas pode ser regulada ainda de várias outras maneiras: pela concentração do substrato, pela presença de efetores alostéricos, por modificações covalentes ou por ligação de proteínas reguladoras – por todas essas maneiras, a atividade de uma molécula de enzima pode ser alterada (Figura 15-2, 7 a 10).

Todas as enzimas são sensíveis à concentração de seu(s) substrato(s) (Figura 15-2, 7). Lembre-se de que, no caso mais simples (enzima que segue a cinética de Michaelis-Menten), a velocidade inicial da reação é a metade da velocidade máxima quando o substrato está presente em uma concentração igual à K_m (i.e., quando metade da enzima está saturada com o substrato). A atividade é reduzida com $[S]$ mais baixa, e quando $[S] \ll K_m$, a velocidade da reação é linearmente dependente da $[S]$.

Essa relação entre $[S]$ e K_m é importante, uma vez que as concentrações intracelulares do substrato estão frequentemente na mesma faixa da K_m ou mais baixas. Por exemplo, a atividade de hexocinase altera-se com a [glicose], e a concentração intracelular de glicose varia com sua concentração no sangue. Conforme será visto, as diferentes formas (isoenzimas) da hexocinase têm diferentes valores de K_m , sendo, por isso, afetadas de modo diferente por mudanças na concentração intracelular de glicose, o que fisiologicamente faz sentido. Para muitas transferências de grupos

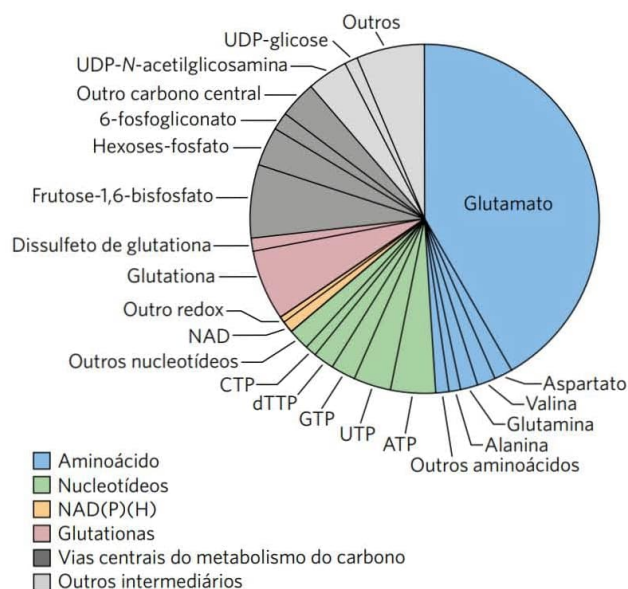


FIGURA 15-3 O metaboloma da *E. coli* crescendo em meio com glicose. Resumo das quantidades de 103 metabólitos, medidas por uma combinação de cromatografia líquida e espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS). [Fonte: dados obtidos de B. D. Bennett et al., *Nature Chem. Biol.* 5:593, 2009, Fig. 1.]

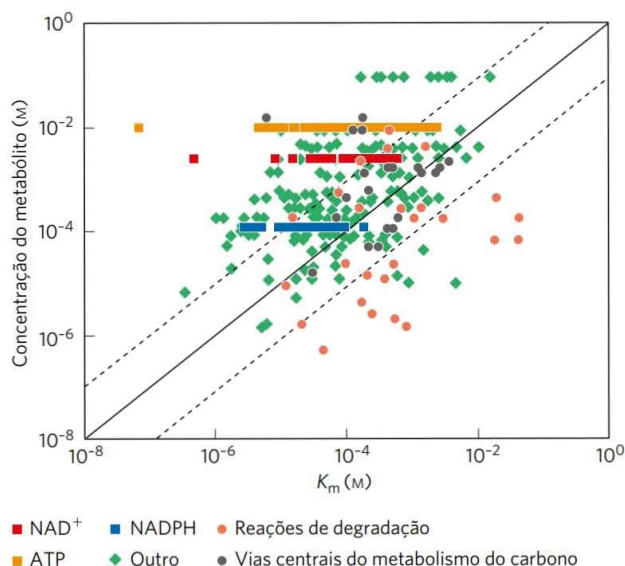


FIGURA 15-4 Comparação entre a K_m e a concentração do substrato de algumas enzimas metabólicas. As concentrações medidas de metabólitos na *E. coli* crescendo em glicose estão colocadas no gráfico contra as K_m conhecidas das enzimas que consomem esses metabólitos. A linha sólida é a da unidade (na qual a concentração do metabólito = K_m) e as linhas tracejadas correspondem cada uma a um desvio de dez vezes da linha da unidade. [Fonte: dados obtidos de B. D. Bennett et al., *Nature Chem. Biol.* 5:593, 2009, Fig. 2.]

fosforila do ATP e para as reações *redox* que usam NADPH ou NAD^+ , a concentração do metabólito está bem acima da K_m (Figura 15-4), de modo que esses cofatores não parecem ser o fator limitante nessas reações.

PROBLEMA 15-1 Atividade de um transportador de glicose

Se K_t (o equivalente à K_m) para o transportador da glicose no fígado (GLUT2) por 40 mM, calcule o efeito do aumento da concentração da glicose sanguínea de 3 mM para 10 mM na velocidade do seu fluxo para dentro do hepatócito.

Solução: utiliza-se a Equação 11-1 (p. 408) para calcular a velocidade inicial (fluxo) da captação da glicose.

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]_{\text{fora}}}{K_t + [S]_{\text{fora}}}$$

Em 3 mM de glicose

$$\begin{aligned} V_0 &= V_{\max} (3 \text{ mM}) / (40 \text{ mM} + 3 \text{ mM}) \\ &= V_{\max} (3 \text{ mM} / 43 \text{ mM}) = 0,07 V_{\max} \end{aligned}$$

Em 10 mM de glicose

$$\begin{aligned} V_0 &= V_{\max} (10 \text{ mM}) / (40 \text{ mM} + 10 \text{ mM}) \\ &= V_{\max} (10 \text{ mM} / 50 \text{ mM}) = 0,20 V_{\max} \end{aligned}$$

Assim, uma elevação da glicose sanguínea de 3 mM para 10 mM aumenta a taxa de influxo do açúcar em um hepatócito em um fator de $0,20/0,07 \approx 3$.

A atividade enzimática pode ser tanto aumentada como reduzida por um efetor alostérico (Figura 15-2, 8; ver Figura 6-35). Os efetores alostéricos normalmente convertem cinéticas hiperbólicas em sigmóides, ou vice-versa (p. ex., ver Figura 15-16b). Na parte mais íngreme da curva sigmoide, uma pequena alteração na concentração do substrato, ou do efetor alostérico, pode ter um grande impacto na velocidade da reação. Lembre-se, do Capítulo 5 (p. 167), de que a cooperatividade de uma enzima alostérica pode ser expressa como um coeficiente de Hill, com coeficientes mais altos significando maior cooperatividade. Para uma enzima alostérica com coeficiente de Hill de 4, a atividade aumenta de 10 para 90% da V_{\max} com apenas 3 vezes de aumento da [S], comparado com o aumento de 81 vezes na [S] necessário para uma enzima sem os efeitos cooperativos (coeficiente de Hill de 1; Tabela 15-2).

As modificações covalentes das enzimas ou de outras proteínas (Figura 15-2, 9) ocorrem em segundos ou minutos após um sinal regulador, geralmente um sinal extracelular. As modificações mais comuns são fosforilação e desfosforilação (Figura 15-5); até metade das proteínas de uma célula eucariótica é fosforilada em alguma situação. A fosforilação por uma proteína-quinase específica pode afetar as características eletrostáticas do sítio ativo da enzima, provocar o deslocamento de uma região inibidora da enzima para fora do sítio ativo, alterar a interação da enzima com outras proteínas, ou forçar mudanças conformacionais que se traduzem em alterações na V_{\max} ou na K_m . Para que as modificações covalentes sejam úteis na regulação, a célula deve ser capaz de fazer a enzima alterada retornar ao seu estado original de atividade. Uma família das fosfoproteínas-fosfatase, que estão, pelo menos algumas delas, sob regulação, catalisa a desfosforilação de proteínas.

Por fim, muitas enzimas são reguladas pela associação a, e dissociação de, outra proteína reguladora (Figura 15-2, 10). Por exemplo, a proteína-quinase A dependente de AMP cíclico (PKA; ver Figura 12-6) é inativa até que a ligação

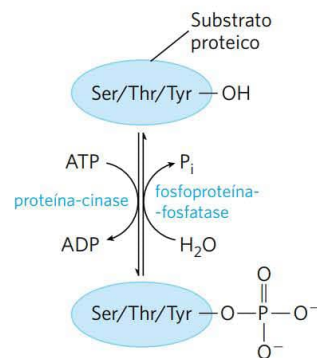


FIGURA 15-5 Fosforilação e desfosforilação de proteínas. As proteínas-quinase transferem um grupo fosforila do ATP para resíduos de Ser, Thr ou Tyr em uma enzima ou outro substrato proteico. As proteínas-fosfatase removem o grupo fosforila como P_i .

com o cAMP separe a subunidade reguladora (inibidora) da subunidade catalítica da enzima.

Esses vários mecanismos que alteram o fluxo por uma etapa de uma via metabólica não são mutuamente exclusivos. É muito comum que uma determinada enzima seja regulada no nível de transcrição e também por mecanismos alostéricos e covalentes. As combinações proporcionam regulação rápida, fácil e eficaz em resposta a uma ampla gama de perturbações e sinais.

Nas discussões que seguem, é útil pensar em mudanças na atividade enzimática servindo a dois papéis distintos, mas complementares. Usa-se o termo **regulação metabólica** para abranger processos que servem para manter a homeostasia no nível molecular – para manter algum parâmetro celular (p. ex., concentração de um metabólito) em estado estacionário ao longo do tempo, mesmo que o fluxo dos metabólitos se altere ao longo da via. O termo **controle metabólico** refere-se a um processo que conduz a uma alteração no resultado de uma via metabólica ao longo do tempo, em resposta a um sinal externo ou a uma mudança nas condições. A distinção, embora útil, nem sempre é fácil de ser feita.

As reações longe do equilíbrio são pontos de regulação usuais nas células

Para algumas etapas de uma via metabólica, a reação está próxima do equilíbrio, com a célula no seu estado estacionário dinâmico (Figura 15-6). O fluxo líquido de metabólitos nessas etapas é a pequena diferença entre a velocidade da reação direta e da reação inversa, velocidades muito semelhantes quando a reação está próxima do equilíbrio. Pequenas alterações nas concentrações do substrato ou do produto podem produzir grandes alterações na taxa líquida, podendo mesmo mudar o sentido do fluxo líquido. É possível identificar essas reações próximas do equilíbrio em uma célula comparando-se a **razão da ação das massas, Q** , com a constante de equilíbrio para a reação, K'_{eq} . Lembre-se de que, na reação $A + B \rightarrow C + D$, $Q = [C][D]/[A][B]$. Quando Q e K'_{eq} estiverem dentro de 1 a 2 ordens de grandeza

TABELA 15-2 Relação entre o coeficiente de Hill e o efeito da concentração do substrato sobre a velocidade da reação de enzimas alostéricas

Coeficiente de Hill (n_H)	Mudança requerida na [S] para aumentar a V_0 de 10 para 90% da V_{\max}
0,5	$\times 6.600$
1,0	$\times 81$
2,0	$\times 9$
3,0	$\times 4,3$
4,0	$\times 3$

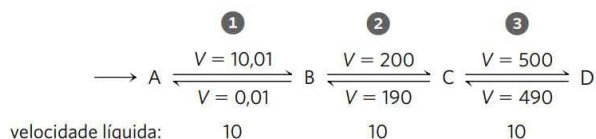


FIGURA 15-6 Etapas fora e próximas do equilíbrio em uma via metabólica. As etapas 2 e 3 desta via estão próximas do equilíbrio na célula; para cada etapa, a velocidade (V) da reação no sentido direto é levemente maior do que a velocidade da reação reversa, de modo que a velocidade líquida para a frente (10) é relativamente baixa, e a variação de energia livre, ΔG , é próxima de zero. Um aumento na $[C]$ ou na $[D]$ pode reverter o sentido dessas etapas. A etapa 1 é mantida longe do equilíbrio na célula; sua velocidade para a frente é muito maior do que a da reação reversa. A velocidade líquida da etapa 1 (10) é muito maior do que a da reação reversa (0,01) e é idêntica à velocidade líquida das etapas 2 e 3 quando a via está operando no estado estacionário. A etapa 1 tem um ΔG negativo grande.

entre si, a reação está próxima do equilíbrio. Esse é o caso em 6 das 10 etapas da via glicolítica (Tabela 15-3).

Outras reações na célula estão longe do equilíbrio. Por exemplo, K'_{eq} para a reação da fosfofrutocinase 1 (PFK-1) é de cerca de 1.000, mas Q ([frutose-1,6-bisfosfato]/[frutose-6-fosfato][ATP]) em um hepatócito no estado estacionário é de cerca de 0,1 (Tabela 15-3). Isto é, *em função* disso, a reação está tão longe do equilíbrio que o processo é exergônico sob condições celulares e tende a ir adiante. A reação é mantida longe do equilíbrio porque, sob condições normalmente encontradas de concentrações

de substrato, de produto e de efetor, a taxa de conversão da frutose-6-fosfato a frutose-1,6-bisfosfato está limitada pela atividade da PFK-1, ela própria limitada pelo número de moléculas de PFK-1 presentes e pela ação dos efetores alostéricos. Assim, a taxa líquida da reação direta catalisada pela enzima é igual ao fluxo líquido dos intermediários glicolíticos por outras etapas da via, e o fluxo inverso pela PFK-1 permanece próximo de zero.

A célula *não pode* permitir que reações com grandes constantes de equilíbrio alcancem o equilíbrio. Se [frutose-6-fosfato], [ATP] e [ADP] na célula forem mantidas em níveis típicos (concentrações milimolares baixas) e for permitido à reação da PFK-1 alcançar o equilíbrio por uma elevação na [frutose-1,6-bisfosfato], a concentração desse produto se elevará para a faixa molar, causando danos osmóticos à célula. Considere outro caso: se fosse permitido à reação $ATP \rightarrow ADP + P_i$ se aproximar do equilíbrio, a variação real de energia livre (ΔG) para essa reação (ΔG_p ; ver Problema 13-2, p. 509) se aproximaria de zero, e o ATP perderia o potencial de transferência do grupo fosforil de alta energia, que o torna valioso para a célula. Dessa forma, é essencial que as enzimas que catalisam a degradação do ATP e outras reações altamente exergônicas sejam sensíveis à regulação, de forma que, quando as mudanças metabólicas forem forçadas por condições externas, o fluxo por essas enzimas seja ajustado para assegurar que a [ATP] permaneça muito acima do seu nível de equilíbrio. Quando essas mudanças metabólicas ocorrem, as atividades das enzimas em todas as vias interconectadas se ajustam para manter as eta-

TABELA 15-3 Constantes de equilíbrio, coeficientes de ação das massas e variações da energia livre para enzimas do metabolismo de carboidratos

Enzima	K'_{eq}	Razão de ação das massas, Q		A reação está próxima ao equilíbrio <i>in vivo</i> ? ^a	$\Delta G'^{\circ}$ (kJ/mol)	ΔG (kJ/mol) no coração
		Fígado	Coração			
Hexocinase	1×10^3	2×10^{-2}	8×10^{-2}	Não	-17	-27
PFK-1	$1,0 \times 10^3$	9×10^{-2}	3×10^{-2}	Não	-14	-23
Aldolase	$1,0 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-6}$	9×10^{-6}	Sim	+24	-6,0
Triose-fosfato-isomerase	4×10^{-2}	— ^b	$2,4 \times 10^{-1}$	Sim	+7,5	+3,8
Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase + fosfoglicerato-cinase	2×10^3	6×10^2	9,0	Sim	-13	+3,5
Fosfoglicerato-mutase	1×10^{-1}	1×10^{-1}	$1,2 \times 10^{-1}$	Sim	+4,4	+0,6
Enolase	3	2,9	1,4	Sim	-3,2	-0,5
Piruvato-cinase	2×10^4	7×10^{-1}	40	Não	-31	-17
Fosfoglicose-isomerase	4×10^{-1}	$3,1 \times 10^{-1}$	$2,4 \times 10^{-1}$	Sim	+2,2	-1,4
Piruvato-carboxilase + PEP-carboxicinas	7	1×10^{-3}	— ^b	Não	-5,0	-23
Glicose-6-fosfatase	$8,5 \times 10^2$	$1,2 \times 10^2$	— ^b	Sim	-17	-5,0

Fonte: K'_{eq} e Q obtidos de E. A. Newsholme e C. Start, Regulation in Metabolism, pp. 97, 263, Wiley Press, 1973. ΔG e $\Delta G'^{\circ}$ foram calculados a partir desses dados.

^aPara simplificar, qualquer reação na qual o valor absoluto do ΔG calculado seja menor do que 6 é considerada próxima do equilíbrio.

^bDados não disponíveis.

pas cruciais longe do equilíbrio. Assim, não é surpreendente que muitas enzimas (como a PFK-1) que catalisam reações altamente exergônicas estejam sujeitas a uma grande variedade de mecanismos reguladores refinados. A multiplicidade desses ajustes é tão grande que é impossível prever só pelo exame das propriedades de uma enzima qualquer em uma via se essa enzima tem uma grande influência no fluxo líquido por toda a via. Esse problema complexo pode ser abordado pela análise do controle metabólico, conforme descrito na Seção 15.2.

Os nucleotídeos de adenina têm papéis especiais na regulação metabólica

Talvez nada seja mais importante para uma célula, após a proteção de seu DNA contra danos, do que a manutenção de um suprimento e de uma concentração de ATP constantes. Muitas enzimas que utilizam ATP têm valores de K_m entre 0,1 e 1 mM, sendo que a concentração de ATP em uma célula típica é de 5 a 10 mM (Figura 15-4). Se a [ATP] diminuir significativamente, essas enzimas não estarão totalmente saturadas pelo seu substrato (ATP), e as velocidades de centenas de reações que envolvem ATP seriam reduzidas (Figura 15-7); a célula provavelmente não sobreviveria a esse efeito *cinético* sobre tantas reações.

Existe também um efeito *termodinâmico* importante na redução da [ATP]. Uma vez que o ATP é convertido em ADP ou AMP quando é “gasto” para realizar trabalho celular, a relação [ATP]/[ADP] afeta profundamente todas as reações que utilizam esses cofatores. (O mesmo é verdadeiro para outros cofatores importantes, como NADH/NAD⁺ e NADPH/NADP⁺.) Considere, por exemplo, a reação catalisada pela hexocinase:

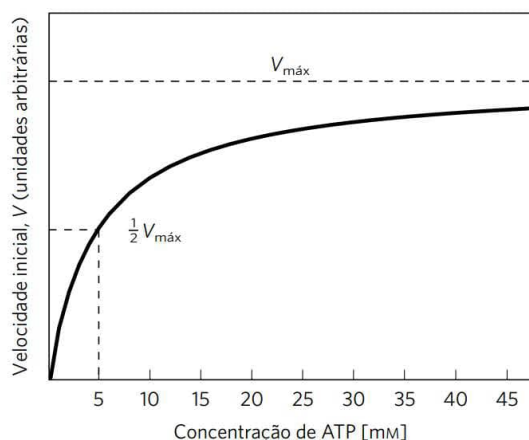
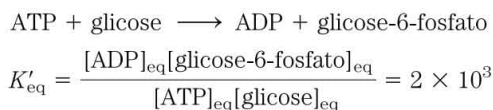


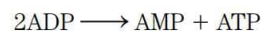
FIGURA 15-7 Efeito da concentração de ATP sobre a velocidade inicial da reação de uma enzima dependente de ATP típica. Estes dados experimentais produzem uma K_m de 5 mM para o ATP. A concentração de ATP nos tecidos animais é de aproximadamente 5 mM.

Observe que esta expressão *somente* é verdadeira quando os reagentes e os produtos estiverem nas suas concentrações de *equilíbrio*, quando $\Delta G' = 0$. Em qualquer outra combinação de concentrações, $\Delta G'$ não é zero. Lembre-se (do Capítulo 13) de que a razão entre produtos e substratos (a razão da ação das massas, Q) determina a magnitude e o sinal de $\Delta G'$, e, portanto, a força motriz, $\Delta G'$, da reação:

$$\Delta G' = \Delta G'^{\circ} + RT \ln \frac{[\text{ADP}][\text{glicose-6-fosfato}]}{[\text{ATP}][\text{glicose}]}$$

Uma vez que uma alteração nessa força motriz influencia profundamente cada reação que envolve ATP, os organismos evoluíram sob intensa pressão para desenvolver mecanismos reguladores que respondam à razão [ATP]/[ADP].

A concentração de AMP é um indicador ainda mais sensível do estado energético da célula do que a [ATP]. As células normalmente têm uma concentração muito maior de ATP (5 a 10 mM) do que de AMP (< 0,1 mM). Quando alguns processos (p. ex., contração muscular) consomem ATP, o AMP é produzido em duas etapas. Primeiro, a hidrólise do ATP produz ADP, e, depois, a reação catalisada pela **adenilil-cinase** produz AMP:



Se o ATP for consumido de forma que sua concentração diminua 10%, o aumento *relativo* na [AMP] é muito maior do que na [ADP] (Tabela 15-4). Assim, não é surpreendente que muitos processos reguladores sejam comandados por alterações na [AMP]. O mediador mais importante da regulação por AMP provavelmente seja a **proteína-cinase ativada por AMP (AMPK)**, que responde a um aumento na [AMP] fosforilando enzimas-chave, regulando, assim, suas atividades. (A AMPK não deve ser confundida com a proteína-cinase dependente de AMP *cíclico*, PKA; ver Seção 15.5.) A elevação da [AMP] pode ser causada por um suprimento reduzido de nutrientes ou pelo aumento do exercício. O AMP ativa alostericamente a AMPK, causando uma alteração conformacional, que torna a AMPK um bom substrato para a fosforilação por outra proteína-cinase, a LKB1. A fosforilação de um resíduo específico de Thr pela LKB1 aumenta em muitas vezes a atividade da AMPK. A LKB1, por sua vez, é regulada por muitos fatores, incluindo o estresse metabólico. A atividade da AMPK aumenta o transporte de glicose e ativa a glicólise e a oxidação de ácidos graxos, ao mesmo tempo em que suprime processos que requerem energia, como a síntese de glicogênio, de ácidos graxos, de colesterol e de proteínas (Figura 15-8). Por exemplo, a AMPK reduz a síntese de glicogênio pela fosforilação (com inibição) da enzima glicogênio-sintase (ver a seguir). Todas as alterações efetuadas pela AMPK têm a finalidade de aumentar a [ATP] e diminuir a [AMP]. No Capítulo 23, será discutido o papel da AMPK no equilíbrio entre anabolismo e catabolismo no organismo como um todo.

Centenas de intermediários metabólicos, além do ATP, devem estar presentes na célula em concentrações apropriadas. Para tomar somente um exemplo: os intermediários glicolíticos di-hidroxiacetona-fosfato e 3-fosfoglicerato são,

TABELA 15-4 Variações relativas na [ATP] e na [AMP] quando o ATP é consumido

Nucleotídeo de adenina	Concentração antes da depleção de ATP (mM)	Concentração após a depleção de ATP (mM)	Variação relativa
ATP	5,0	4,5	10%
ADP	1,0	1,0	0
AMP	0,1	0,6	600%

respectivamente, precursores de triacilgliceróis e serina. Quando esses produtos são necessários, a velocidade da glicólise deve se ajustar para fornecê-los sem reduzir a produção glicolítica de ATP. Isso também ocorre na manutenção dos níveis de outros cofatores importantes, como NADH e NADPH: mudanças em suas razões de ação das massas (i.e., na relação entre cofator reduzido e oxidado) têm efeitos sobre o metabolismo.

As prioridades do *organismo* como um todo, é claro, também impulsionaram a evolução dos mecanismos reguladores. O encéfalo de mamíferos quase não possui estoques de fontes de energia, dependendo de um suprimento constante de glicose a partir do sangue. Se a glicose sanguínea diminuir da sua concentração normal de 4,5 a 5 mM para a metade desse nível, o resultado é confusão mental, e uma redução de cinco vezes pode levar ao coma

e à morte. Para proteger contra mudanças na concentração sanguínea de glicose, a liberação dos hormônios insulina e glucagon, provocada pela glicose sanguínea alta ou baixa, respectivamente, causa mudanças metabólicas que tendem a fazer a concentração sanguínea da glicose voltar ao normal.

Outras pressões seletivas devem ter agido ao longo da evolução, selecionando mecanismos reguladores que cumpram o que segue:

1. Maximizar a eficiência da utilização dos combustíveis por impedir o funcionamento simultâneo de vias em direções opostas (como glicólise e gliconeogênese).
2. Separar os metabólitos apropriadamente em vias alternativas (como a glicólise e a via das pentoses-fosfato).

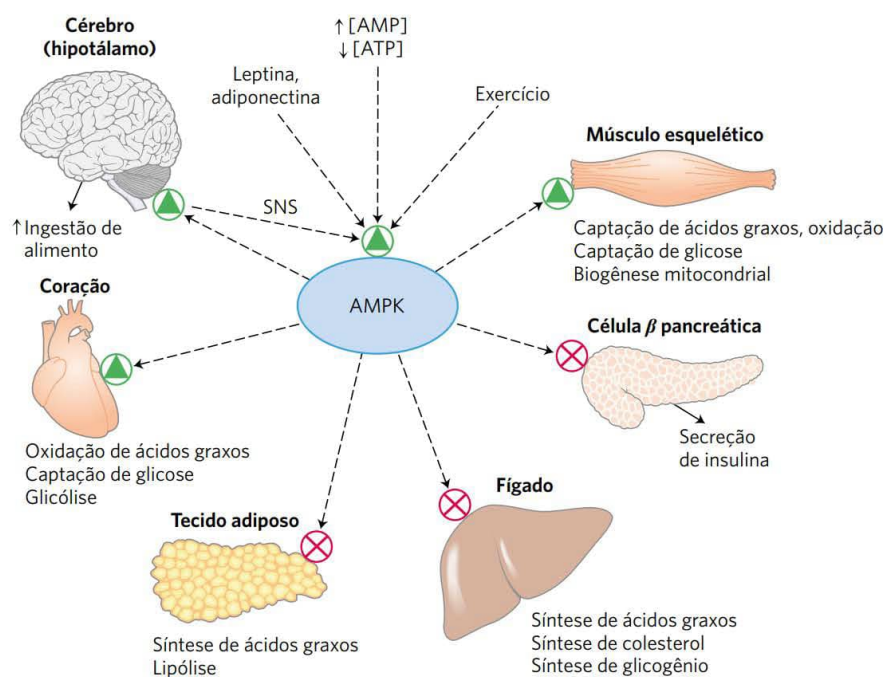


FIGURA 15-8 Papel da proteína-quinase ativada por AMP (AMPK) no metabolismo de carboidratos e de gorduras. A AMPK é ativada por [AMP] elevada ou por [ATP] reduzida, pelo exercício, pelo sistema nervoso simpático (SNS), ou por hormônios peptídicos produzidos no tecido adiposo (leptina e adiponectina, descritos em mais detalhes no Capítulo 23). A AMPK, quando ativada, fosforila proteínas-alvo e altera o metabolismo de uma grande variedade de tecidos, distanciando-o dos processos que consomem energia, como a síntese de glicogênio, de ácidos graxos e de colesterol; altera o metabolismo nos tecidos extra-hepáticos para o uso de ácidos graxos como combustível; e desencadeia a gliconeogênese no fígado para fornecer glicose para o encéfalo. No hipotálamo, a AMPK estimula o comportamento alimentar para fornecer mais combustível a partir da dieta.

3. Mobilizar o combustível mais adequado para as necessidades imediatas do organismo (glicose, ácidos graxos, glicogênio ou aminoácidos).
4. Reduzir a velocidade de vias biossintéticas quando seus produtos se acumulam.

Os capítulos remanescentes deste livro apresentam muitos exemplos de cada um dos tipos de mecanismos reguladores.

RESUMO 15.1 Regulação das vias metabólicas

- Em uma célula metabolicamente ativa no estado estacionário, os intermediários são formados e utilizados em taxas iguais. Quando uma perturbação transitória altera a taxa de formação ou de utilização de um metabólito, alterações compensatórias nas atividades das enzimas reconduzem o sistema ao estado estacionário.
- As células regulam seu metabolismo por meio de uma grande variedade de mecanismos em uma escala de tempo que varia de menos de um milissegundo até dias, tanto pela mudança na atividade de moléculas enzimáticas preexistentes quanto pela mudança no número de moléculas de uma enzima específica.
- Vários sinais ativam ou inativam fatores de transcrição, que atuam no núcleo e regulam a expressão gênica. Mudanças no transcriptoma levam a mudanças no proteoma e, por fim, no metaboloma de uma célula ou tecido.
- Nos processos com múltiplas etapas, como a glicólise, determinadas reações estão essencialmente em equilíbrio no estado estacionário; as velocidades dessas reações aumentam e diminuem com a concentração do substrato. Outras reações estão fora do equilíbrio; essas etapas são, geralmente, os pontos de regulação global da via.
- Os mecanismos reguladores mantêm níveis praticamente constantes de metabólitos-chave, como ATP e NADH, nas células e glicose no sangue, enquanto adaptam o uso ou a produção de glicose às necessidades variáveis do organismo.
- Os níveis de ATP e de AMP são um reflexo sensível do estado energético da célula, e quando a razão [ATP]/[AMP] diminui, a proteína-cinase ativada por AMP (AMPK) desencadeia uma grande variedade de respostas celulares para elevar a [ATP] e reduzir a [AMP].

15.2 Análise do controle metabólico

Estudos detalhados da regulação metabólica só se tornaram possíveis depois da elucidação das etapas químicas básicas das vias e da caracterização das enzimas responsáveis. Tendo como ponto de partida a descoberta de Eduard Buchner (por volta de 1900) de que um extrato de células de levedura lisadas poderia converter glicose em etanol e CO_2 , o impulso principal da pesquisa bioquímica foi decifrar as etapas pelas quais essa transformação ocorria e purificar e caracterizar as enzimas que catalisavam cada etapa. Na metade do século XX, todas as 10 enzimas da via glicolítica estavam purificadas e caracterizadas. Nos 50 anos seguintes, aprendeu-se muito sobre a regulação dessas enzimas, por



Eduard Buchner, 1860-1917
[Fonte: Science Photo Library/Science Source.]

sinais extra e intracelulares, por meio dos mecanismos covalentes e alostéricos descritos neste capítulo. O critério convencional era que, em uma via linear, como a glicólise, a catálise por uma das enzimas deveria ser a mais lenta, determinando, desse modo, a velocidade do fluxo metabólico por toda a via. No caso da glicólise, a PFK-1 foi considerada a enzima de velocidade limitante, uma vez que se sabe que é regulada pela frutose-2,6-bisfosfato e outros efetores alostéricos.

Com o advento da tecnologia da engenharia genética, tornou-se possível testar essa hipótese da “única etapa determinante da velocidade” pelo aumento da concentração da enzima que catalisa a “etapa limitante da velocidade” em uma via e pela determinação do aumento proporcional do fluxo ao longo da via. Com frequência, não aumenta; a solução simples (uma única etapa determinante da velocidade) está errada. Atualmente está claro que, na maioria das vias, o controle do fluxo é distribuído entre várias enzimas, e o grau com que cada uma contribui para o controle varia com as condições metabólicas – o suprimento do material de partida (p. ex., glicose), o suprimento de oxigênio, a necessidade de outros produtos derivados de intermediários da via (como a glicose-6-fosfato para a via das pentoses-fosfato em células que sintetizam grande quantidade de nucleotídeos), os efeitos dos metabólitos com funções reguladoras e o estado hormonal do organismo (os níveis de insulina e glucagon), entre outros fatores.

Por que o interesse nos fatores que limitam o fluxo por uma via? Para entender a ação dos hormônios ou de fármacos, ou a patologia que resulta de uma falha na regulação metabólica, é preciso saber onde é exercido o controle. Se os pesquisadores desejam desenvolver um fármaco que estimule ou iniba uma via, o alvo lógico é a enzima que tenha o maior impacto no fluxo por esta via. A bioengenharia de um microrganismo para produzir uma grande quantidade de um produto de valor comercial (p. 327) requer um conhecimento do que limita o fluxo de metabólitos para este produto.

A contribuição de cada enzima para o fluxo através de uma via é determinada experimentalmente

Existem várias maneiras de determinar experimentalmente como uma variação na atividade de uma enzima em uma via afeta o fluxo metabólico por ela. Considere os resultados experimentais mostrados na **Figura 15-9**. Quando uma amostra de fígado de rato foi homogeneizada para liberar todas as enzimas solúveis, o extrato realizou a conversão glicolítica da glicose em frutose-1,6-bisfosfato a uma velocidade mensurável. (Para simplificar, esse experimento está focado somente na primeira parte da via glicolítica.) Quando foram adicionadas ao extrato quantidades crescentes de hexocinase IV (glicocinase) purificada, a velocidade da

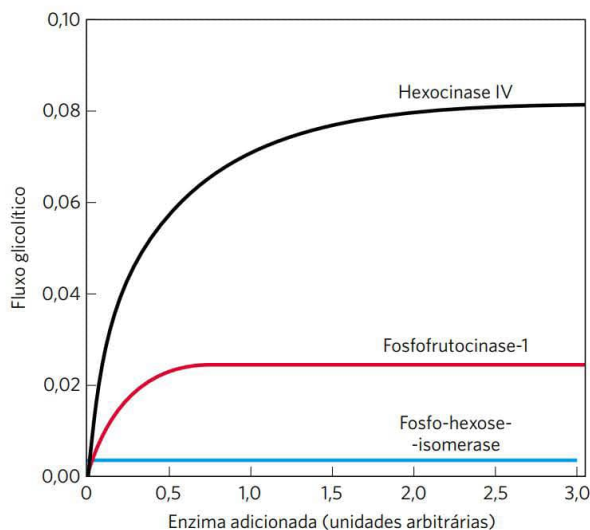


FIGURA 15-9 Dependência do fluxo glicolítico em relação a enzimas adicionadas em um homogeneizado de fígado de rato. Enzimas purificadas, nas quantidades mostradas no eixo do x, foram adicionadas a um extrato de fígado realizando glicólise. O aumento no fluxo ao longo da via é mostrado no eixo do y. [Fonte: dados obtidos de N. V. Torres et al., *Biochem. J.* 234:169, 1986.]

glicólise aumentou gradualmente. A adição de PFK-1 purificada também aumentou a velocidade da glicólise, mas não tão significativamente quanto a hexocinase. A adição de fosfo-hexose-isomerase purificada não teve efeito. Esses resultados sugerem que ambas, a hexocinase e a PFK-1, contribuem para determinar o fluxo pela via (hexocinase mais do que PFK-1), e que a fosfo-hexose-isomerase não o faz.

Experimentos semelhantes podem ser feitos em células intactas ou em organismos, usando inibidores ou ativadores específicos para alterar a atividade de uma enzima e observar ao mesmo tempo o efeito sobre o fluxo pela via. A quantidade de uma enzima também pode ser alterada geneticamente; a bioengenharia pode produzir uma célula que faça cópias extras da enzima em estudo ou ter uma versão da enzima menos ativa do que a enzima normal. O aumento genético da concentração de uma enzima às vezes causa efeitos significativos no fluxo e às vezes não tem efeito.

Três parâmetros fundamentais, que, juntos, descrevem a capacidade de resposta de uma via a mudanças nas condições metabólicas, estão no centro da **análise do controle metabólico**. Agora, será feita uma descrição qualitativa desses parâmetros e de seu significado no contexto de uma célula viva. O Quadro 15-1 fornece uma descrição quantitativa mais rigorosa.

O coeficiente de controle de fluxo quantifica o efeito de uma alteração na atividade enzimática sobre o fluxo metabólico por uma via

Dados quantitativos sobre fluxo metabólico, obtidos conforme a descrição da Figura 15-9, podem ser usados para calcular um **coeficiente de controle de fluxo, C** , para cada uma das enzimas de uma via. Esse coeficiente expres-

sa a contribuição relativa de cada enzima na determinação da velocidade na qual os metabólitos fluem pela via – isto é, o **fluxo, J** . C pode ter qualquer valor, de 0,0 (para enzimas sem impacto sobre o fluxo) a 1,0 (para enzimas que determinam totalmente o fluxo). Uma enzima também pode ter um coeficiente *negativo* de controle de fluxo. Em uma via ramificada, uma enzima em um ramo, pelo fato de remover intermediários de outro ramo, pode ter um impacto negativo sobre o fluxo por esse outro ramo (**Figura 15-10**). C não é uma constante, não sendo intrínseco a uma única enzima; é uma função de todo o sistema de enzimas, e seu valor depende da concentração dos substratos e dos efetores.

Quando dados reais de experimentos de glicólise em extratos de fígado de rato (Figura 15-9) foram submetidos a esse tipo de análise, os pesquisadores constataram coeficientes de controle de fluxo (para as enzimas nas concentrações encontradas no extrato) de 0,79 para a hexocinase, 0,21 para a PFK-1, e 0,0 para a fosfo-hexose-isomerase. Não é por acaso que esses valores somam 1,0; é possível mostrar que, para qualquer via completa, a soma dos coeficientes de controle de fluxo deve ser igual à unidade.

O coeficiente de elasticidade está relacionado com a capacidade de resposta da enzima a alterações na concentração do metabólito ou do regulador

Um segundo parâmetro, o **coeficiente de elasticidade, ε** , expressa quantitativamente a capacidade de resposta de uma única enzima a alterações na concentração de um metabólito ou de um regulador; é função das propriedades cinéticas intrínsecas da enzima. Por exemplo, uma enzima com típica cinética de Michaelis-Menten mostra uma resposta hiperbólica ao aumento da concentração do substrato (**Figura 15-11**). Em baixas concentrações do substrato (p. ex., 10% da K_m), cada incremento na concentração do substrato resulta em um aumento comparável na atividade enzimática, produzindo um ε próximo de 1,0. Em concentrações de substrato relativamente altas (p. ex., 10 vezes a K_m), o aumento da concentração do substrato tem efeito pequeno sobre a velocidade da reação, uma vez que a enzima já está saturada com o substrato. A elasticidade nesse caso se aproxima de zero. Para enzimas alostéricas que apresentem cooperatividade positiva, o ε pode exceder 1,0, mas não excede o coeficiente de Hill, que está entre 1,0 e 4,0.

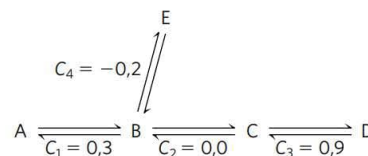


FIGURA 15-10 O coeficiente de controle de fluxo, C , em uma via metabólica ramificada. Nesta via simples, o intermediário B tem dois destinos alternativos. À medida que a reação $\text{B} \rightarrow \text{E}$ remove B da via $\text{A} \rightarrow \text{D}$, ela controla esta via, o que resulta em um coeficiente de controle de fluxo *negativo* para a enzima que catalisa a etapa $\text{B} \rightarrow \text{E}$. Observe que a soma dos quatro coeficientes é igual a 1,0, como deve ser para qualquer sistema de enzimas definido.

QUADRO 15-1 MÉTODOS Análise do controle metabólico: aspectos quantitativos

Os fatores que influenciam a circulação dos intermediários (fluxo) ao longo de uma via podem ser determinados quantitativamente de modo experimental, sendo expressos em termos úteis para a predição da alteração no fluxo quando ocorrer alteração de algum fator envolvido na via. Considere a sequência de reações simples na Figura Q-1, na qual um substrato X (p. ex., glicose) é convertido, em várias etapas, em um produto Z (talvez piruvato, formado na glicólise). Uma das enzimas tardias na rota é uma desidrogenase (ydh) que atua sobre o substrato Y. Uma vez que a atividade da desidrogenase é facilmente medida (ver Figura 13-24), é possível usar o fluxo (J) por essa etapa (J_{ydh}) para medir o fluxo ao longo de toda a via. Manipula-se experimentalmente o nível de uma enzima inicial na via (xase, que atua sobre o substrato X) e mede-se o fluxo ao longo da via (J_{ydh}) para vários níveis da enzima xase.

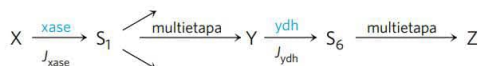


FIGURA Q-1 Fluxo ao longo de uma via multienzimática hipotética.

A relação entre o fluxo pela via de X a Z na célula intacta e a concentração de cada enzima da via deve ser hiperbólica, praticamente sem fluxo, quando a atividade enzimática for infinitamente baixa, e com fluxo próximo ao máximo quando a atividade enzimática for muito alta. Em uma curva de J_{ydh} contra a concentração da xase, E_{xase} , a mudança no fluxo com uma pequena alteração no nível da enzima é $\partial J_{ydh} / \partial E_{xase}$, que é simplesmente a inclinação da tangente da curva em qualquer concentração da enzima E_{xase} , e que tende a zero na E_{xase} saturante. Em baixa E_{xase} , a inclinação é íngreme; o fluxo aumenta com cada incremento na atividade enzimática. Em E_{xase} muito alta, a inclinação é muito menor; o sistema é menos responsivo à adição de xase porque ela já está presente em excesso em relação às outras enzimas da via.

Para demonstrar quantitativamente a dependência do fluxo na via, $\partial J_{ydh} / \partial E_{xase}$, poderíamos usar a razão $\partial J_{ydh} / \partial E_{xase}$. Sua utilidade, contudo, é limitada, pois seu valor depende das unidades utilizadas para expres-

sar o fluxo da atividade da enzima. Pela expressão das mudanças fracionais no fluxo e na atividade enzimática, $\partial J_{ydh} / J_{ydh}$ e $\partial E_{xase} / E_{xase}$, obtém-se uma expressão unificadora para o coeficiente de controle de fluxo, C , neste caso $C_{xase}^{J_{ydh}}$.

$$C_{xase}^{J_{ydh}} \approx \frac{\partial J_{ydh} / J_{ydh}}{\partial E_{xase} / E_{xase}} \quad (1)$$

Isto pode ser rearranjado para:

$$C_{xase}^{J_{ydh}} \approx \frac{\partial J_{ydh}}{\partial E_{xase}} \cdot \frac{E_{xase}}{J_{ydh}}$$

que é matematicamente idêntico a

$$C_{xase}^{J_{ydh}} \approx \frac{\partial \ln J_{ydh}}{\partial \ln E_{xase}}$$

Esta equação sugere um meio gráfico simples de determinar o coeficiente de controle de fluxo: $C_{xase}^{J_{ydh}}$ é a inclinação da tangente da curva de $\ln J_{ydh}$ versus $\ln E_{xase}$, que pode ser obtida pela utilização dos dados experimentais da Figura Q-2a em outro gráfico para se obter a Figura Q-2b. Observe que $C_{xase}^{J_{ydh}}$ não é uma constante; ele depende da E_{xase} inicial a partir da qual acontece a alteração no nível enzimático. Para os casos mostrados na Figura Q-2, $C_{xase}^{J_{ydh}}$ é de aproximadamente 1,0 na E_{xase} mais baixa, mas somente cerca de 0,2 em alta E_{xase} . Um valor próximo de 1,0 para $C_{xase}^{J_{ydh}}$ significa que a concentração da enzima determina totalmente o fluxo pela via; um valor próximo de 0,0 significa que a concentração da enzima não limita o fluxo pela via. Alterações na atividade da enzima não terão forte efeito sobre o fluxo, a menos que o coeficiente de controle de fluxo seja maior do que 0,5.

O **coeficiente de elasticidade**, ε , de uma enzima é uma medida de como a atividade catalítica dessa enzima se altera com a alteração da concentração de um metabólito – substrato, produto ou efetor. A medida é obtida a partir de uma curva experimental da velocidade da reação catalisada pela enzima versus a concentração do metabólito, nas concentrações prevalentes na célula. Usando argumentos análogos aos utilizados para

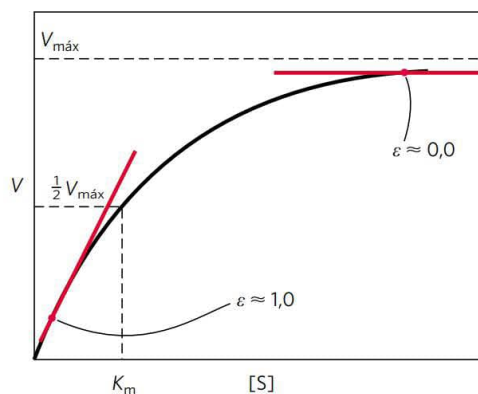


FIGURA 15-11 Coeficiente de elasticidade, ε , de uma enzima com a cinética de Michaelis-Menten. Em concentrações de substrato bastante abaixo da K_m , cada aumento na $[S]$ produz um aumento correspondentemente grande na velocidade da reação, V . Para esta região da curva, a enzima tem um ε de cerca de 1,0. Em $[S] \gg K_m$, o aumento da $[S]$ tem pouco efeito sobre V ; ε , aqui, é próximo de 0,0.

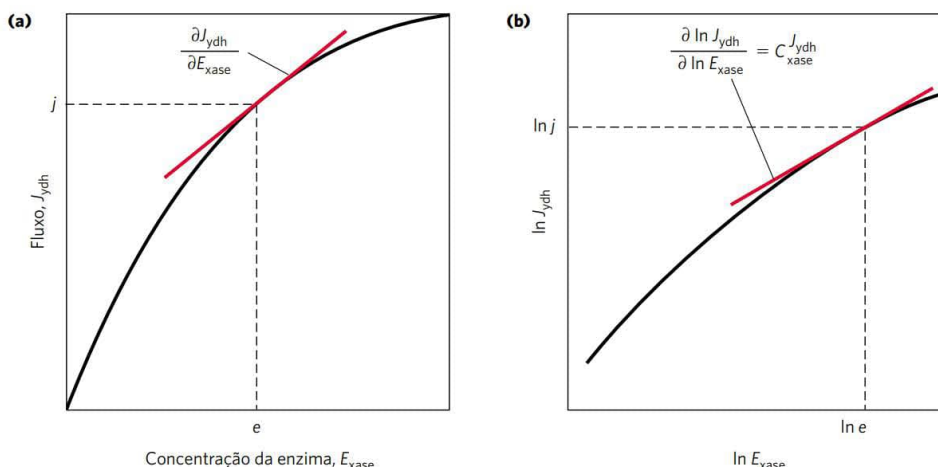


FIGURA Q-2 Coeficiente de controle de fluxo. **(a)** Variação típica do fluxo na via, J_{ydh} , medida na etapa catalisada pela enzima ydh, como uma função da quantidade da enzima xase, E_{xase} , que catalisa uma etapa mais inicial na via. O coeficiente de controle de fluxo em (e, j) é a inclinação do produto da tangente da curva, $\partial J_{ydh} / \partial E_{xase}$, e a relação (fator de inclinação) e/j . **(b)** Em um gráfico de duplo logaritmo da mesma curva, o coeficiente de controle de fluxo é a inclinação da tangente da curva.

deduzir C , é possível mostrar que ε é a inclinação da tangente da curva de $\ln V$ versus \ln [substrato, produto ou efetor]:

$$\varepsilon_S^{xase} = \frac{\partial V_{xase}}{\partial S} \cdot \frac{S}{V_{xase}} = \frac{\partial \ln V_{xase}}{\partial \ln S}$$

Para uma enzima com a cinética de Michaelis-Menten típica, o valor de ε varia de cerca de 1 em concentrações de substrato muito abaixo da K_m a próximo de 0 quando se aproxima da $V_{máx}$. As enzimas alostéricas podem ter elasticidade maior que 1,0, mas não maior que seu coeficiente de Hill (p. 167).

Finalmente, o efeito de controladores de fora da própria via, (i.e., não metabólitos) pode ser medido e expresso como o **coeficiente de resposta, R** . A alteração no fluxo através da via é medida por meio das variações nas concentrações de parâmetros de controle

P , e R é definido de modo análogo ao da Equação 1, dando a expressão

$$R_P^{J_{ydh}} = \frac{\partial J_{ydh}}{\partial P} \cdot \frac{P}{J_{ydh}}$$

Usando a mesma lógica e os métodos gráficos descritos anteriormente para determinar C , obtém-se R como a inclinação da tangente da curva de $\ln J$ versus $\ln P$.

Os três coeficientes descritos estão relacionados desta maneira simples:

$$R_P^{J_{ydh}} = C_{xase}^{J_{ydh}} \cdot \varepsilon_P^{xase}$$

Assim, a capacidade de resposta de cada enzima em uma via a uma alteração em um fator controlador externo é uma função simples de duas coisas: o coeficiente de controle variável, que expressa o quanto essa enzima influencia o fluxo sob um dado conjunto de condições, e a elasticidade, propriedade intrínseca da enzima que reflete a sua sensibilidade à concentração do substrato e do efetor.

O coeficiente de resposta expressa o efeito de um controlador externo sobre o fluxo de uma via

Também é possível derivar uma expressão quantitativa para o impacto relativo de um fator externo (hormônio ou fator de crescimento), que não é nem metabólito nem uma enzima da via, sobre o fluxo pela via. O experimento mede o fluxo pela via (nesse caso, glicólise) em vários níveis do parâmetro P (p. ex., concentração de insulina) para obter o **coeficiente de resposta, R** , que expressa a alteração no fluxo quando P (insulina) se altera.

Esses três coeficientes, C , ε e R , estão relacionados de uma maneira simples: a capacidade de resposta (R) de uma via a um fator externo que afeta uma determinada enzima

é uma função de (1) quão sensível é a via a mudanças na atividade dessa enzima (o coeficiente de controle de fluxo, C) e (2) quão sensível é a enzima específica a mudanças no fator controlador externo (a elasticidade, ε):

$$R = C \cdot \varepsilon$$

Cada enzima da via pode ser examinada dessa forma, e os efeitos de qualquer um de vários fatores externos sobre o fluxo na via podem ser determinados separadamente. Assim, em princípio, é possível prever de que maneira será alterado o fluxo do substrato por uma série de etapas enzimáticas quando existe uma alteração em um ou mais fatores controladores externos à via. O Quadro 15-1 mostra como esses conceitos qualitativos são tratados quantitativamente.

A análise do controle metabólico foi aplicada ao metabolismo de carboidratos, com resultados surpreendentes

A análise do controle metabólico proporciona uma estrutura que permite pensar quantitativamente sobre regulação, interpretar o significado das propriedades reguladoras de cada enzima em uma via, identificar as etapas que mais afetam o fluxo pela via e distinguir entre os mecanismos *reguladores* que atuam na manutenção das concentrações dos metabólitos e os mecanismos de *controle* que alteram efetivamente o fluxo da via. A análise da via glicolítica em leveduras, por exemplo, revelou um coeficiente de controle de fluxo para a PFK-1 inesperadamente baixo, o qual, como se percebe, era considerado como o ponto principal do controle do fluxo – a “etapa determinante da velocidade” – na glicólise. A elevação experimental do nível da PFK-1 em cinco vezes leva a uma alteração no fluxo pela glicólise de menos de 10%, sugerindo que o papel real da regulação pela PFK-1 não é controlar o fluxo pela glicólise, mas mediar a homeostasia de metabólitos – para prevenir grandes mudanças na concentração dos metabólitos quando o fluxo pela glicólise aumenta em resposta à glicose sanguínea alta ou à insulina. Lembre-se de que o estudo da glicólise em extrato de fígado (Figura 15-9) também produziu um coeficiente de controle de fluxo que discordou do conhecimento convencional; ele mostrou que a hexocinase, e não a PFK-1, é mais influente no ajuste do fluxo ao longo da glicólise. Deve-se observar, aqui, que o extrato de fígado não é equivalente a um hepatócito; a maneira ideal de estudar o controle do fluxo é manipulando uma enzima de cada vez na célula viva. Isso é possível em muitos casos.

Os pesquisadores usaram ressonância magnética nuclear (RMN) como uma maneira não invasiva de determinar a concentração de glicogênio e de metabólitos nas cinco etapas da via desde a glicose no sangue até o glicogênio nos miócitos (**Figura 15-12**) de músculo de rato e de seres humanos. Eles descobriram que o coeficiente de controle de fluxo pela glicogênio-sintase foi menor do que para o transportador de glicose (GLUT4) ou para a hexocinase. (A glicogênio-sintase e outras enzimas do metabolismo do glicogênio serão discutidas nas Seções 15.4 e 15.5.) Esse achado contradiz o conhecimento convencional de que a glicogênio-sintase é o local de controle do fluxo e sugere que a importância da fosforilação/desfosforilação dessa enzima esteja relacionada com a manutenção da homeostasia de metabólitos – isto é, *regulação*, e não *controle*. Dois metabólitos dessa via, glicose e glicose-6-fosfato, são intermediários-chave em outras vias, incluindo a glicólise, a via das pentoses-fosfato e a síntese da glicosamina. A análise do controle metabólico sugere que, quando o nível da glicose sanguínea se eleva, a insulina atua no músculo para (1) aumentar o transporte da glicose para as células, levando GLUT4 para a membrana plasmática, (2) induzir a síntese de hexocinase e (3) ativar a glicogênio-sintase por modificação covalente (ver Figura 15-41). Os dois primeiros efeitos da insulina aumentam o fluxo de glicose pela via (controle), e o terceiro serve para adaptar a atividade da glicogênio-

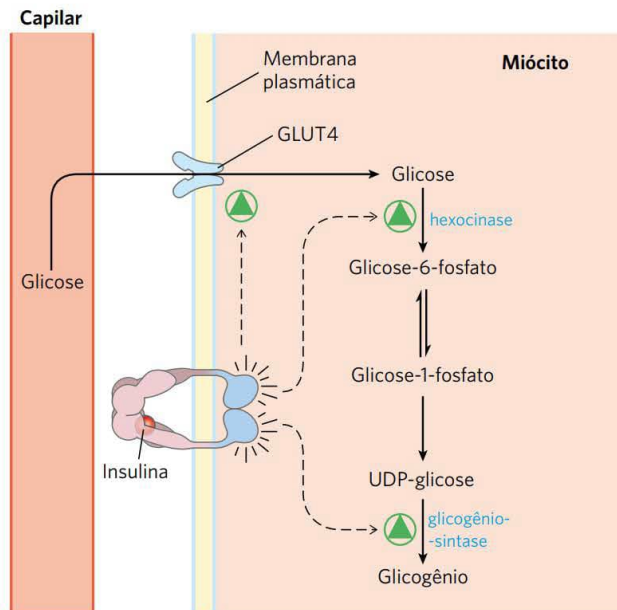


FIGURA 15-12 Controle da síntese de glicogênio no músculo, a partir da glicose sanguínea. A insulina afeta três das cinco etapas desta via, mas é o efeito sobre o transporte e sobre a atividade da hexocinase que aumenta o fluxo para o glicogênio, e não a mudança na atividade da glicogênio-sintase.

-sintase, de modo que os níveis de metabólitos (p. ex., glicose-6-fosfato) não aumentem drasticamente com o fluxo aumentado (regulação).

A análise do controle metabólico sugere um método geral para o aumento do fluxo por uma via

Como um pesquisador pode manipular uma célula para aumentar o fluxo em uma via sem alterar as concentrações dos outros metabólitos ou os fluxos ao longo de outras vias? Mais de três décadas atrás, Henrik Kacser previu, com base na análise do controle metabólico, que isso seria possível pelo aumento da concentração de cada enzima da via. A predição foi confirmada em vários testes experimentais, e também concorda com a maneira pela qual as células normalmente controlam os fluxos ao longo das vias. Por exemplo, ratos alimentados com dieta rica em proteína eliminam o excesso de grupos amina, convertendo-os em ureia no ciclo da ureia (Capítulo 18). Com essa mudança da dieta, a produção de ureia aumenta quatro vezes, e as quantidades das enzimas relacionadas ao ciclo da ureia aumentam de duas a três vezes. De modo similar, quando o aumento da oxidação dos ácidos graxos é desencadeado pela ativação do receptor γ ativado por proliferador de peroxissomo (PPAR γ , um fator de transcrição ativado por ligante; ver Figura 21-22), aumenta a síntese de *toda a série* de enzimas de oxidação dos ácidos graxos. Com o crescimento do uso de microarranjos de DNA no estudo da expressão de grupos completos de genes em resposta a várias perturbações, acredita-se que logo se saberá se esse é um mecanismo ge-

ral pelo qual as células realizam ajustes de longo prazo no fluxo ao longo de vias específicas.

RESUMO 15.2 Análise do controle metabólico

- A análise do controle metabólico mostra que o controle da velocidade do fluxo metabólico por uma via se distribui entre várias enzimas na via.
- O coeficiente de controle de fluxo, C , é uma medida determinada experimentalmente do efeito da concentração de uma enzima sobre o fluxo por uma via multienzimática. Não é uma característica intrínseca da enzima, mas do sistema como um todo.
- O coeficiente de elasticidade, ϵ , de uma enzima é uma medida determinada experimentalmente de sua capacidade de resposta a alterações na concentração de um metabólito ou de uma molécula reguladora.
- O coeficiente de resposta, R , é uma medida determinada experimentalmente da alteração no fluxo por uma via em resposta a um hormônio regulador ou a um segundo mensageiro. É uma função de C e de ϵ : $R = C \cdot \epsilon$.
- Algumas enzimas reguladas controlam o fluxo ao longo de uma via, ao passo que outras reequilibram o nível dos metabólitos em resposta a alterações no fluxo. A primeira atividade é *controle*; a segunda, de reequilíbrio, é *regulação*.
- A análise do controle metabólico prevê, e os experimentos confirmam, que o fluxo na direção de um produto específico é aumentado de maneira mais eficiente pela elevação da concentração de todas as enzimas da via.

15.3 Regulação coordenada da glicólise e da gliconeogênese

Nos mamíferos, a **gliconeogênese** acontece principalmente no fígado, que tem o papel de fornecer glicose para exportar para outros tecidos quando se esgotam os estoques de glicogênio e quando não há disponibilidade de glicose na dieta. Conforme discutido no Capítulo 14, a gliconeogênese utiliza várias das enzimas que atuam na glicólise, mas não é simplesmente o seu reverso. Sete reações glicolíticas são livremente reversíveis, e as enzimas que catalisam essas reações também atuam na gliconeogênese (**Figura 15-13**). Três reações da glicólise, de tão exergônicas, são essencialmente irreversíveis: as catalisadas por hexocinase, PFK-1 e piruvato-cinase. As três reações têm um ΔG grande e negativo (a Tabela 15-3 mostra os valores no músculo cardíaco). A gliconeogênese usa desvios em cada uma dessas etapas irreversíveis; por exemplo, a conversão da frutose-1,6-bisfosfato em frutose-6-fosfato é catalisada pela frutose-1,6-bisfosfatase (FBPase-1). Cada uma dessas reações de desvio também tem um ΔG grande e negativo.

Em cada um dos três pontos onde as reações glicolíticas são desviadas por reações gliconeogênicas alternativas, a operação simultânea de ambas as vias consumiria ATP sem

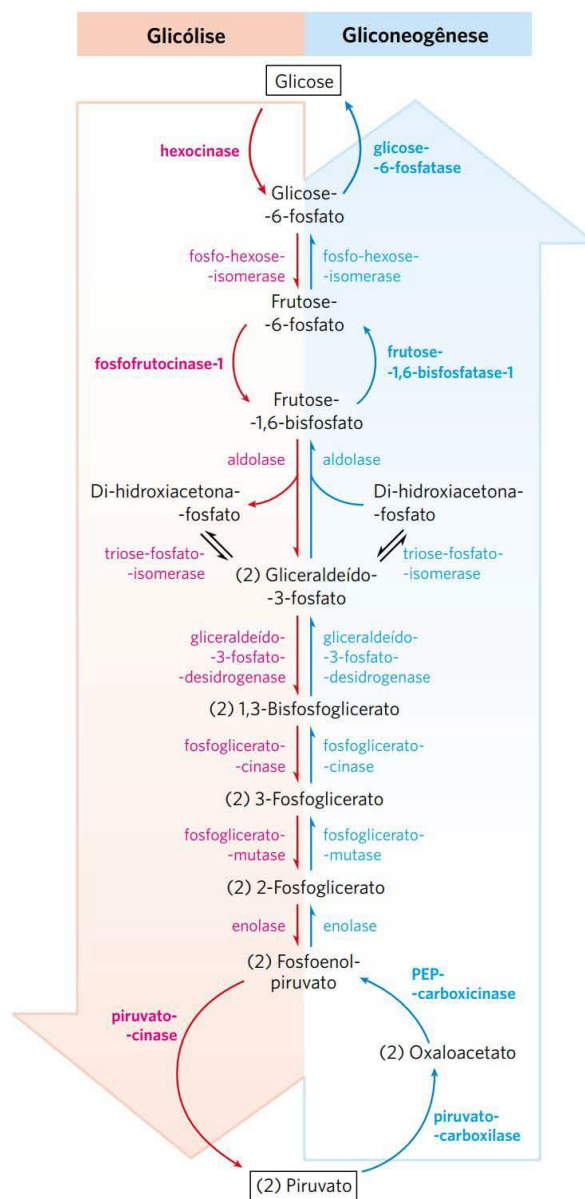
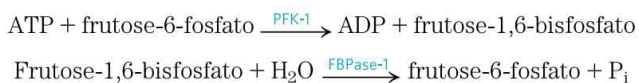
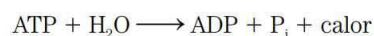


FIGURA 15-13 Glicólise e gliconeogênese. Vias opostas da glicólise (em cor-de-rosa) e da gliconeogênese (em azul) no fígado de rato. Três etapas são catalisadas por enzimas diferentes na gliconeogênese (as “reações de desvio”) e na glicólise; sete etapas são catalisadas pelas mesmas enzimas nas duas vias. Para simplificar, os cofatores foram omitidos.

realizar nenhum trabalho químico ou biológico. Por exemplo, a PFK-1 e a FBPase-1 catalisam reações opostas:



A soma dessas duas reações é



isto é, hidrólise de ATP sem realizar nenhuma atividade metabólica útil. Se essas duas reações prosseguirem simultaneamente em uma velocidade alta na mesma célula, uma grande quantidade de energia química será dissipada na forma de calor. Este processo antieconômico é denominado **ciclo fútil**. No entanto, como será visto mais tarde, esses ciclos podem proporcionar vantagens em vias de controle, e o termo **ciclo de substrato** é uma denominação melhor. Ciclos de substrato semelhantes também ocorrem com os outros dois grupos de reações de desvio na gliconeogênese (Figura 15-13).

Agora, serão analisados com mais detalhes os mecanismos que regulam a glicólise e a gliconeogênese nos três pontos nos quais essas vias divergem.

As isoenzimas da hexocinase do músculo e do fígado são afetadas diferentemente por seu produto, glicose-6-fosfato

A hexocinase, que catalisa a entrada da glicose na via glicolítica, é uma enzima reguladora. Os seres humanos têm quatro isoenzimas (designadas de I a IV), codificadas por quatro genes diferentes. As **isoenzimas** são proteínas diferentes que catalisam a mesma reação (Quadro 15-2). A isoenzima predominante da hexocinase nos miócitos (**hexocinase II**) apresenta alta afinidade por glicose – está com 50% de saturação em cerca de 0,1 mM. Uma vez que a glicose que entra nos miócitos a partir do sangue (onde sua concentração é

QUADRO 15-2 Isoenzimas: proteínas diferentes que catalisam a mesma reação

As quatro formas de hexocinase encontradas nos tecidos de mamíferos são apenas um exemplo de uma situação biológica comum: a mesma reação sendo catalisada por duas ou mais formas moleculares diferentes da mesma enzima. Essas múltiplas formas, chamadas de isozimas ou isoenzimas, podem ocorrer na mesma espécie, no mesmo tecido, até na mesma célula. As diferentes formas (isoformas) da enzima geralmente diferem nas propriedades cinéticas ou reguladoras, no cofator utilizado (p. ex., NADH ou NADPH no caso das isoenzimas-desidrogenase), ou na sua distribuição subcelular (solúvel ou ligada à membrana). As isoenzimas podem ter sequências de aminoácidos similares, mas não idênticas, e, em muitos casos, elas compartilham claramente uma origem evolutiva comum.

Uma das primeiras enzimas para a qual se encontrou isoenzimas foi a lactato-desidrogenase (LDH; p. 553), que existe nos tecidos dos vertebrados em pelo menos cinco formas diferentes separáveis por eletroforese. Todas as isoenzimas de LDH têm quatro cadeias polipeptídicas (cada uma com M_r de 33.500), e cada tipo tem uma proporção diferente de dois tipos de polipeptídeos. A cadeia M (de músculo) e a cadeia H (de coração) são codificadas por dois genes diferentes.

A isoenzima predominante no músculo esquelético possui quatro cadeias M, e, no coração, a isoenzima predominante possui quatro cadeias H. Outros tecidos têm combinações dos cinco tipos possíveis de LDH:

Tipo	Composição	Localização
LDH ₁	HHHH	Coração e eritrócito
LDH ₂	HHHM	Coração e eritrócito
LDH ₃	HHMM	Encéfalo e rim
LDH ₄	HMMM	Músculo esquelético e fígado
LDH ₅	MMMM	Músculo esquelético e fígado



As diferenças no conteúdo das isoenzimas entre os tecidos podem ser usadas para avaliar o período e a extensão do dano cardíaco em consequência de um infarto do miocárdio (ataque cardíaco). O dano ao tecido cardíaco resulta na liberação de LDH para o san-

gue. Logo após um infarto do miocárdio, o nível sanguíneo total de LDH aumenta, e existe mais LDH₂ do que LDH₁. Após 12 horas, as quantidades de LDH₁ e de LDH₂ são muito semelhantes, e após 24 horas existe mais LDH₁ do que LDH₂. Essa mudança na relação $[LDH_1]/[LDH_2]$, combinada com o aumento da concentração sanguínea de outra enzima cardíaca, a creatina-quinase, é evidência muito forte de um infarto do miocárdio recente. ■

As diferentes isoenzimas de LDH apresentam valores de V_{\max} e K_m significativamente diferentes, sobretudo para o piruvato. As propriedades da LDH₄ favorecem a rápida redução de piruvato a lactato no músculo esquelético, mesmo em concentrações muito baixas, ao passo que as propriedades da isoenzima LDH₁ favorecem a oxidação rápida do lactato a piruvato no coração.

Em geral, a distribuição das diferentes isoenzimas de uma dada enzima reflete pelo menos quatro fatores:

1. *Padrões metabólicos diferentes em órgãos diferentes.* Para a glicogênio-fosforilase, as isoenzimas no músculo esquelético e no fígado têm propriedades reguladoras diferentes, refletindo os diferentes papéis da degradação do glicogênio nesses dois tecidos.
2. *Localizações e papéis metabólicos diferentes para isoenzimas na mesma célula.* As isoenzimas da isocitrato-desidrogenase do citosol e da mitocôndria são um exemplo (Capítulo 16).
3. *Estágios de desenvolvimento diferentes em tecidos fetais ou embrionários e em tecidos adultos.* Por exemplo, o fígado fetal tem uma distribuição característica da isoenzima LDH, que se altera à medida que o órgão se desenvolve na sua forma adulta. Algumas enzimas do catabolismo da glicose em células malignas (cancerosas) ocorrem como suas isoenzimas fetais e não adultas.
4. *Respostas diferentes de isoenzimas aos moduladores alostéricos.* Esta diferença é útil na regulação mais fina das taxas metabólicas. A hexocinase IV (glicocinase) do fígado e as suas isoenzimas de outros tecidos diferem na sua sensibilidade à inibição pela glicose-6-fosfato.

de 4 a 5 mM) gera uma concentração intracelular de glicose suficientemente alta para saturar a hexocinase II, a enzima normalmente age na sua velocidade máxima ou próxima dela. A **hexocinase I** do músculo e a hexocinase II são inibidas alostericamente por seu produto, a glicose-6-fosfato, de forma que, sempre que a concentração intracelular de glicose-6-fosfato se eleva acima do seu nível normal, essas enzimas são temporária e reversivelmente inibidas, levando a velocidade da formação da glicose-6-fosfato ao equilíbrio com a velocidade de sua utilização e reestabelecendo o estado estacionário.

As diferentes isoenzimas de hexocinase do fígado e do músculo refletem os diferentes papéis desses órgãos no metabolismo de carboidratos: o músculo consome glicose, usando-a para produção de energia, ao passo que o fígado mantém a homeostasia da glicose sanguínea, produzindo ou consumindo o açúcar, dependendo da sua concentração sanguínea prevalente. A isoenzima da hexocinase predominante no fígado é a **hexocinase IV (glucocinase)**, que difere das hexocinases I a III de músculo em três importantes aspectos. Em primeiro lugar, a concentração de glicose na qual a hexocinase IV atinge a metade da saturação (cerca de 10 mM) é maior do que sua concentração normal no sangue. Uma vez que um transportador de glicose eficiente nos hepatócitos (**GLUT2**) equilibra rapidamente a concentração de glicose no citosol e no sangue (ver, na Figura 11-28, a cinética do mesmo transportador, GLUT2, em eritrócitos), a alta K_m da hexocinase IV permite sua regulação direta pelo nível de glicose sanguínea (**Figura 15-14**). Quando a glicose sanguínea é alta, como acontece após uma refeição rica em carboidratos, o excesso de glicose é transportado para os hepatócitos, onde a hexocinase IV o converte em glicose-6-fosfato. Como a hexocinase não está saturada em 10 mM de glicose, sua atividade continua aumentando à medida que a concentração da glicose se eleva para 10 mM ou mais. Sob condições de glicose sanguínea baixa, a concentração do açúcar no hepatócito é baixa em relação à K_m da hexocinase IV, e a glicose gerada pela gliconeogênese deixa a célula antes de ficar retida pela fosforilação.

Em segundo lugar, a hexocinase IV não é inibida pela glicose-6-fosfato e, por isso, pode continuar agindo quando o acúmulo desse composto inibe completamente as hexocinases I a III. Por fim, a hexocinase IV está sujeita à inibição

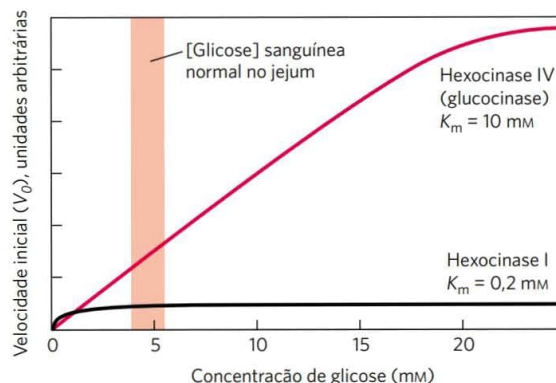


FIGURA 15-14 Comparação entre as propriedades cinéticas da hexocinase IV (glucocinase) e da hexocinase I. Observe a característica sigmoide para a curva da hexocinase IV e a K_m muito mais baixa para a hexocinase I. Quando a glicose sanguínea se eleva acima de 5 mM, a atividade da hexocinase IV aumenta, mas a hexocinase I já está agindo próximo de sua V_{\max} e não pode responder ao aumento da concentração da glicose. As hexocinases I, II e III têm propriedades cinéticas semelhantes.

pela interação reversível com uma proteína reguladora específica do fígado (**Figura 15-15**). A ligação é muito mais forte na presença do efetor alostérico frutose-6-fosfato. A glicose compete com a frutose-6-fosfato e causa a dissociação da proteína reguladora da hexocinase, removendo a inibição. Imediatamente após uma refeição rica em carboidratos, quando a glicose sanguínea estiver alta, ela entra nos hepatócitos via GLUT2 e ativa a hexocinase IV por esse mecanismo. Durante o jejum, quando os níveis de glicose no sangue diminuem para menos de 5 mM, a frutose-6-fosfato provoca a inibição da hexocinase IV pela proteína reguladora, de forma que o fígado não compete com outros órgãos pela glicose escassa. O mecanismo de inibição pela proteína reguladora é interessante: a proteína ancora a enzima hexocinase IV dentro do núcleo, onde ela fica segregada das outras enzimas da glicólise no citosol (Figura 15-15). Quando a concentração da glicose no citosol se eleva, ela equilibra com a glicose no núcleo pelo transporte através dos poros nucleares. A glicose causa a dissociação da proteína reguladora, e a hexocinase IV passa para o citosol e inicia a fosforilação da glicose.

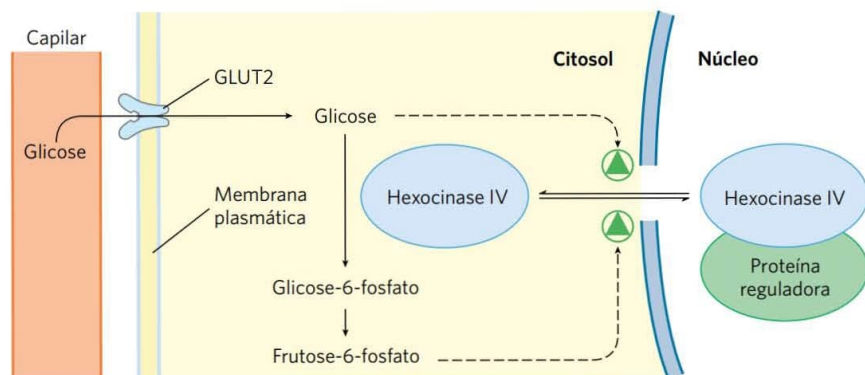


FIGURA 15-15 Regulação da hexocinase IV (glucocinase) por sequestro no núcleo. O inibidor proteico da hexocinase IV é uma proteína de ligação nuclear que carrega a enzima para dentro do núcleo quando a concentração da frutose-6-fosfato está alta no fígado e a libera para o citosol quando a concentração da glicose está alta.

A hexocinase IV (glicocinase) e a glicose-6-fosfatase são reguladas na transcrição

A hexocinase também é regulada no nível de síntese proteica. As condições que demandam uma produção maior de energia (baixa [ATP], alta [AMP], contração muscular vigorosa) ou maior consumo de glicose (p. ex., glicose sanguínea alta) causam aumento na transcrição do gene da hexocinase IV. A glicose-6-fosfatase, a enzima gliconeogênica que faz o desvio da etapa da hexocinase na glicólise, é regulada no nível da transcrição por fatores que demandam aumento na produção de glicose (glicose sanguínea baixa, sinalização por glucagon). A regulação da transcrição dessas duas enzimas (juntamente com outras enzimas da glicólise e da gliconeogênese) está descrita a seguir.

A regulação da fosfofrutocinase 1 e da frutose-1,6-bisfosfatase é recíproca

Conforme observado, a glicose-6-fosfato pode ser usada na glicólise ou por várias outras vias, incluindo na via de síntese do glicogênio ou na via das pentoses-fosfato. A reação metabolicamente irreversível catalisada pela PFK-1 é a etapa que compromete a glicose com a glicólise. Essa enzima complexa tem, além dos seus sítios de ligação ao substrato, vários sítios reguladores aos quais se ligam os ativadores ou os inibidores alostéricos.

O ATP não é somente um substrato para a PFK-1, sendo também um produto final da via glicolítica. Quando a concentração celular alta de ATP sinaliza que ele está sendo produzido mais rapidamente do que está sendo consumido, este inibe a PFK-1 por se ligar a um sítio alostérico na enzima, o que reduz a afinidade da enzima pelo substrato frutose-6-fosfato (**Figura 15-16**). ADP e AMP, cujas concentrações aumentam à medida que o consumo de ATP suplanta a produção, atuam alostericamente para liberar a inibição pelo ATP. Esses efeitos se combinam para produzir atividade enzimática mais elevada quando o ADP e o AMP se acumulam, e mais baixa quando o ATP se acumula.

O citrato (a forma ionizada do ácido cítrico), intermediário-chave na oxidação aeróbica do piruvato, dos ácidos graxos e dos aminoácidos, é também um regulador alostérico da PFK-1; a concentração alta de citrato aumenta o efeito inibidor do ATP, reduzindo ainda mais o fluxo de glicose pela glicólise. Nesse caso, assim como em vários outros encontrados adiante, o citrato serve como sinal intracelular de que a célula está satisfazendo suas necessidades de energia metabólica pela oxidação de ácidos graxos e proteínas.

A etapa correspondente na gliconeogênese é a conversão da frutose-1,6-bisfosfato em frutose-6-fosfato (**Figura 15-17**). A enzima que catalisa essa reação, FBPase-1, é fortemente inibida (alostericamente) pelo AMP; quando o suprimento de ATP da célula está baixo (correspondendo a uma alta [AMP]), diminui a síntese de glicose, que requer ATP.

Assim, essas etapas opostas nas vias glicolítica e gliconeogênica – catalisadas por PFK-1 e FBPase-1 – são reguladas de forma coordenada e recíproca. Em geral, quan-

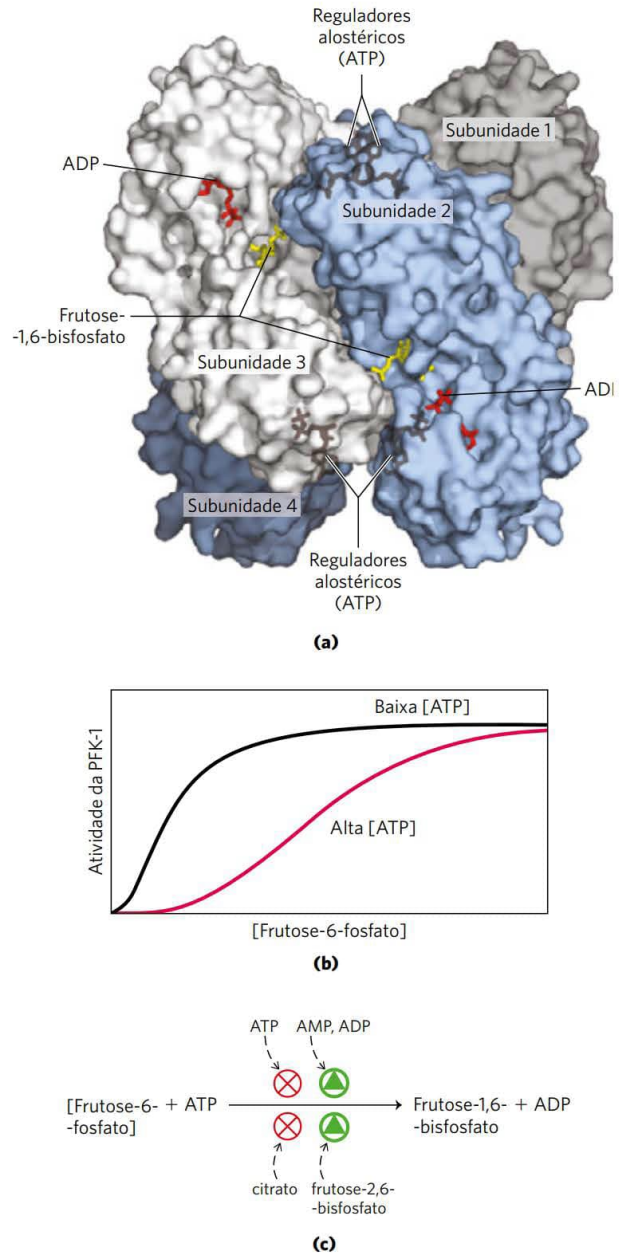


FIGURA 15-16 A fosfofrutocinase 1 (PFK-1) e sua regulação. (a) Imagem de contorno de superfície da PFK-1 de *E. coli*, mostrando porções de suas quatro subunidades idênticas. Cada subunidade tem seu próprio sítio catalítico, no qual os produtos ADP e frutose-1,6-bisfosfato (modelos de esfera e bastão, respectivamente em vermelho e amarelo) quase entram em contato, e seus próprios sítios de ligação ao regulador alostérico ATP, escondido na proteína nas posições indicadas. (b) Regulação alostérica da PFK-1 de músculo pelo ATP, ilustrada pela curva substrato-atividade. Em baixa [ATP], a $K_{0.5}$ para a frutose-6-fosfato é relativamente baixa, permitindo que a enzima atue em uma velocidade alta em [frutose-6-fosfato] relativamente baixa. (Lembre-se, do Capítulo 6, de que $K_{0.5}$ é o termo correspondente à K_m para as enzimas reguladoras.) Quando a [ATP] é alta, $K_{0.5}$ para a frutose-6-fosfato é muito aumentada, conforme indicado pela relação sigmoide entre a concentração do substrato e a atividade enzimática. (c) Resumo dos reguladores que afetam a atividade da PFK-1. [Fonte: (a) PDB ID 1PFK, Y. Shirahihara e P. R. Evans, *J. Mol. Biol.* 204:973, 1988.]

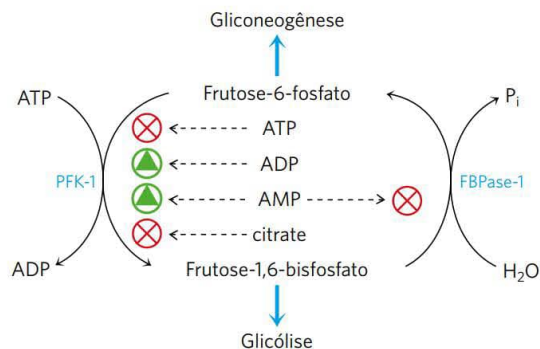


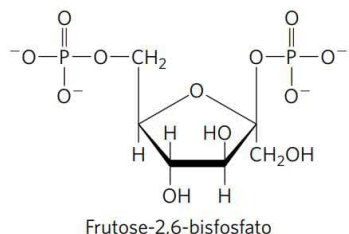
FIGURA 15-17 Regulação da frutose-1,6-bisfosfatase (FBPase-1) e da fosfofrutocinase 1 (PFK-1). O importante papel da frutose-2,6-bisfosfato na regulação deste ciclo de substrato está detalhado nas figuras subsequentes.

do há concentração suficiente de acetil-CoA ou de citrato (produto da condensação da acetil-CoA com oxalacetato), ou quando uma alta proporção do adenilil da célula está na forma de ATP, a gliconeogênese é favorecida. Quando o nível de AMP aumenta, isso promove a glicólise pela estimulação da PFK-1 (e, como será visto na Seção 15.5, promove a degradação do glicogênio pela ativação da glicogênio-fosforilase).

A frutose-2,6-bisfosfato é um regulador alostérico potente da PFK-1 e da FBPase-1

O papel especial do fígado na manutenção de um nível constante de glicose sanguínea requer mecanismos reguladores adicionais para coordenar a produção e o consumo de glicose. Quando o nível de glicose no sangue diminui, o hormônio **glucagon** sinaliza para o fígado produzir e liberar mais glicose e parar de consumi-la para suas próprias necessidades. Uma das fontes de glicose é o glicogênio armazenado no fígado; outra fonte é via da gliconeogênese, usando piruvato, lactato, glicerol ou determinados aminoácidos como material de partida. Quando a glicose sanguínea está alta, a insulina sinaliza para o fígado usar o açúcar como combustível e como precursor na síntese e no armazenamento de glicogênio e triacilglicerol.

A regulação hormonal rápida da glicólise e da gliconeogênese é mediada pela **frutose-2,6-bisfosfato**, o efetor alostérico das enzimas PFK-1 e FBPase-1:



Quando a frutose-2,6-bisfosfato se liga ao seu sítio alostérico na PFK-1, ela aumenta a afinidade dessa enzima pelo seu substrato, frutose-6-fosfato, e reduz a afinidade pelos inibidores alostéricos ATP e citrato (Figura 15-18). Em

concentrações fisiológicas de seus substratos, ATP e frutose 6-fosfato, e de seus outros efetores positivos e negativos (ATP, AMP, citrato), a PFK-1 é praticamente inativa na ausência de frutose-2,6-bisfosfato. A frutose-2,6-bisfosfato tem o efeito oposto sobre a FBPase-1: ela reduz a afinidade da enzima por seu substrato (Figura 15-18b), reduzindo, assim, a velocidade da gliconeogênese.

A concentração celular do regulador alostérico frutose-2,6-bisfosfato é ajustada pelas taxas relativas de sua formação e degradação (Figura 15-19a). Ela se forma pela fosforilação da frutose-6-fosfato, catalisada pela **fosfofrutocinase 2 (PFK-2)** e é degradada pela **frutose-2,6-bisfosfatase (FBPase-2)**. (Observe que essas enzimas são distintas da PFK-1 e da FBPase-1, que catalisam, respectivamente, a síntese e a degradação da frutose-1,6-bisfosfato.) PFK-2 e FBPase-2 são duas atividades enzimáticas separadas de uma única proteína bifuncional. O equilíbrio dessas duas atividades no fígado, que determina o nível celular da frutose-2,6-bisfosfato, é regulado pelo glucagon e pela insulina (Figura 15-19b).

Conforme visto no Capítulo 12 (pp. 449-450), o glucagon estimula a adenilil-ciclase do fígado a sintetizar 3'-5'-AMP cíclico (cAMP) a partir de ATP. O AMP cíclico ativa a proteína-quinase dependente de cAMP, a qual transfere um grupo fosforila do ATP para a proteína bifuncional PFK-2/FBPase-2. A fosforilação dessa proteína aumenta sua atividade de FBPase-2 e inibe a atividade de PFK-2. Dessa forma, o glucagon reduz o nível celular de frutose-2,6-bisfosfato, inibindo a glicólise e estimulando a gliconeogênese. A resultante produção de mais glicose permite ao fígado repor a glicose sanguínea em resposta ao glucagon. A insulina tem o efeito oposto, estimulando a atividade de uma fosfoproteína-fosfatase, que catalisa a remoção do grupo fosforila da proteína bifuncional PFK-2/FBPase-2, ativando sua atividade de PFK-2, aumentando o nível de frutose-2,6-bisfosfato, estimulando a glicólise e inibindo a gliconeogênese.

A xilulose-5-fosfato é um regulador-chave do metabolismo dos carboidratos e das gorduras

Outro mecanismo regulador atua também por meio do controle do nível de frutose-2,6-bisfosfato. No fígado de mamíferos, a xilulose-5-fosfato (p. 567), um produto da via das pentoses-fosfato (ou via das hexoses-monofosfato), controla o aumento da glicólise que se segue à ingestão de uma refeição rica em carboidratos. A concentração da xilulose-5-fosfato aumenta à medida que a glicose que entra no fígado é convertida em glicose-6-fosfato e entra tanto na via glicolítica como na das pentoses-fosfato. A xilulose-5-fosfato ativa a fosfoproteína-fosfatase 2A (PP2A; Figura 15-20), a qual desfosforila a enzima bifuncional PFK-2/FBPase-2 (Figura 15-19). A desfosforilação ativa a PFK-2 e inibe a FBPase-2, e o aumento na concentração da frutose-2,6-bisfosfato estimula a glicólise e inibe a gliconeogênese. A glicólise aumentada impulsiona a produção de acetil-CoA, ao passo que o fluxo aumentado de hexoses pela via das pentoses-fosfato gera NADPH. Acetil-CoA e NADPH são os materiais de partida para a síntese de ácidos graxos e que, sabe-se de longa data, aumentam signi-

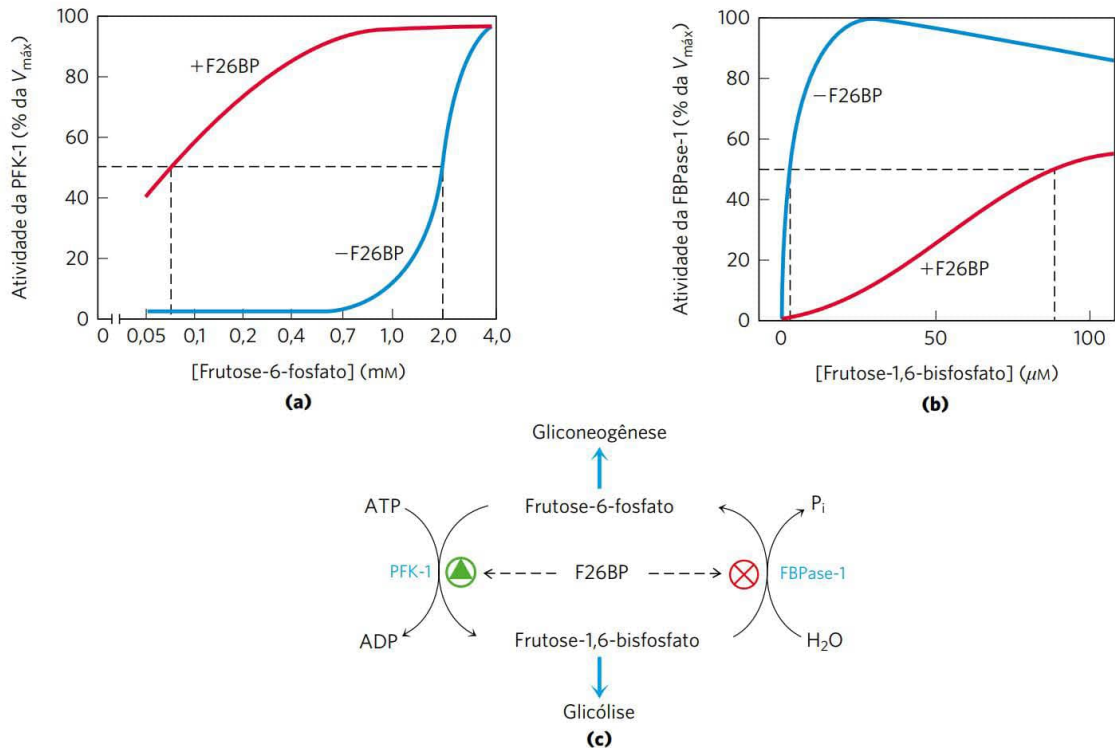


FIGURA 15-18 Papel da frutose-2,6-bisfosfato na regulação da glicólise e da gliconeogênese. A frutose-2,6-bisfosfato (F26BP) tem efeitos opostos sobre as atividades enzimáticas da fosfofrutocinase 1 (PFK-1, uma enzima glicolítica) e da frutose-1,6-bisfosfatase (FBPase-1, uma enzima gliconeogênica). **(a)** A atividade da PFK-1 na ausência de F26BP (curva azul) é a metade da máxima quando a concentração da frutose-6-fosfato é 2 mm (i.e., $K_{0,5} = 2$ mm). Quando 0,13 μM de F26BP está presente (curva vermelha), $K_{0,5}$ para a frutose-6-fosfato é somente 0,08 mm. Assim, a F26BP ativa a PFK-1 por aumentar sua afinidade aparente pela frutose-6-fosfato (ver Figura 15-16b). **(b)** A atividade da FBPase-1 é inibida por 1 μM de F26BP, sendo fortemente inibida por 25 μM . Na ausência desse inibidor (curva azul), $K_{0,5}$ para a frutose-1,6-bisfosfato é 5 μM , porém, na presença de 25 μM de F26BP (curva vermelha), $K_{0,5} > 70$ μM . A frutose-2,6-bisfosfato também torna a FBPase-1 mais sensível à inibição por outro regulador alostérico, o AMP. **(c)** Resumo da regulação por F26BP.

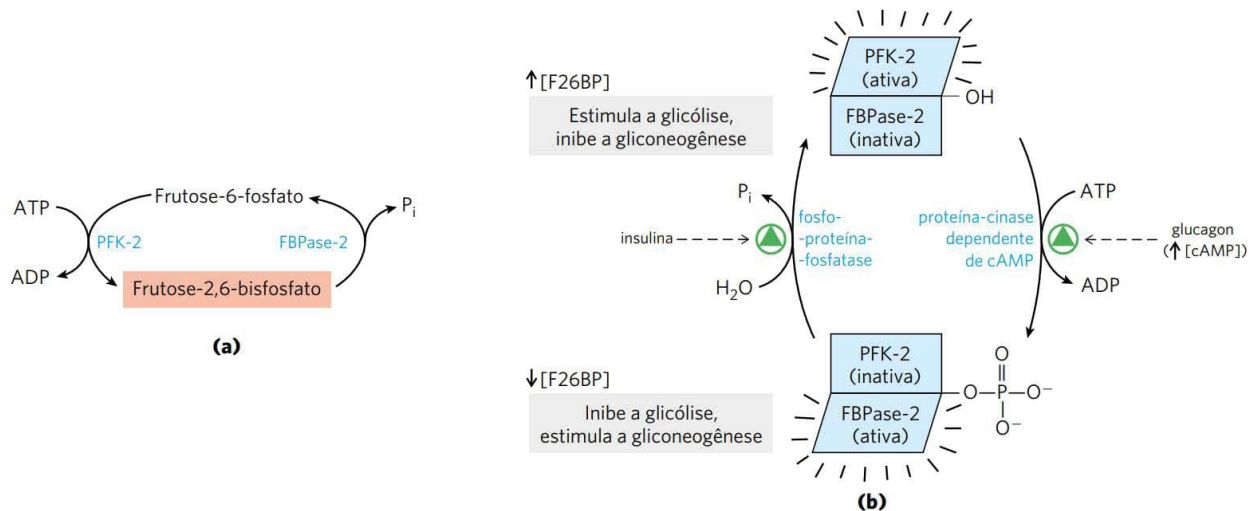


FIGURA 15-19 Regulação no nível da frutose-2,6-bisfosfato. **(a)** A concentração celular do regulador frutose-2,6-bisfosfato (F26BF) é determinada pelas taxas de sua síntese pela fosfofrutocinase-2 (PFK-2) e sua degradação pela frutose-2,6-bisfosfatase (FBPase-2). **(b)** Ambas as atividades enzimáticas são parte da mesma cadeia polipeptídica, sendo reciprocamente reguladas pela insulina e pelo glucagon.

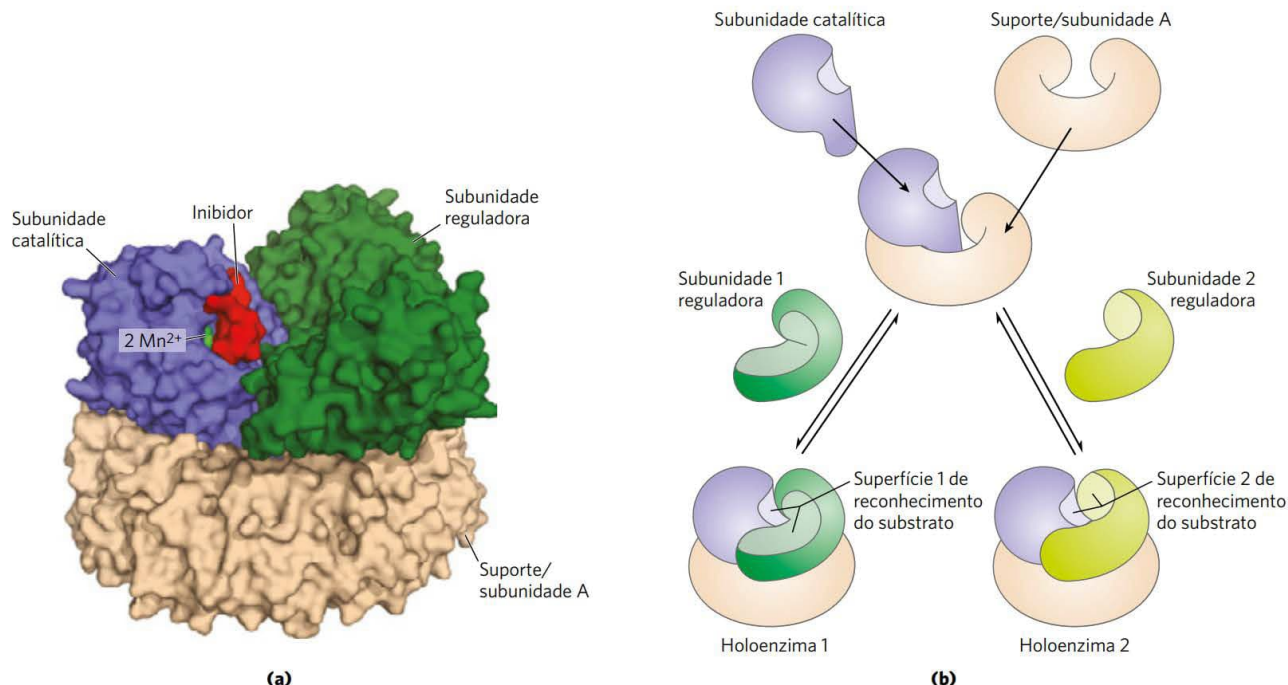


FIGURA 15-20 Estrutura e ação da fosfoproteína-fosfatase 2A (PP2A). (a) A subunidade catalítica tem dois íons Mn^{2+} no seu sítio ativo, posicionados próximos à superfície de reconhecimento do substrato formada pela interface entre a subunidade catalítica e a reguladora. A microcistina-LR, mostrada aqui em vermelho, é um inibidor específico de PP2A. A subunidade catalítica e a reguladora repousam em um suporte (a subunidade A) que as posiciona uma em relação à outra e forma o sítio de reconhecimento do substrato. (b) A PP2A reconhece várias proteínas-alvo, e sua especificidade é proporcionada pela subunidade reguladora. As várias subunidades reguladoras se encaixam no suporte que contém a subunidade catalítica, e cada subunidade cria seu sítio exclusivo de ligação ao substrato. [Fonte: (a) PDB ID 2NPP, Y. Xu et al., *Cell* 127:1239, 2006.]

ficativamente em resposta à ingestão de uma refeição rica em carboidratos. A xilulose-5-fosfato também aumenta a síntese de *todas* as enzimas necessárias para a síntese de ácidos graxos, satisfazendo a predição a partir da análise do controle metabólico. Esse efeito será detalhado na discussão sobre a integração do metabolismo de carboidratos e gorduras no Capítulo 23.

A enzima glicolítica piruvato-cinase é inibida alostericamente por ATP

Nos vertebrados, são encontradas pelo menos três isoenzimas da piruvato-cinase, que diferem na sua distribuição tecidual e nas suas respostas aos moduladores. Altas concentrações de ATP, acetil-CoA e ácidos graxos de cadeia longa (sinais de suprimento abundante de energia) inibem alostericamente todas as isoenzimas da piruvato-cinase (**Figura 15-21**). A isoenzima do fígado (forma L), mas não a do músculo (forma M), está sujeita à regulação adicional por fosforilação. Quando a redução da glicose sanguínea causa a liberação de glucagon, a proteína-cinase dependente de cAMP fosforila a isoenzima L, inativando-a. Isso causa uma redução no uso da glicose como combustível no fígado, poupando-a para exportá-la para o encéfalo e outros órgãos. No músculo, o efeito do aumento da [cAMP] é bem diferente. Em resposta à adrenalina, o cAMP ativa a degradação do glicogênio e a glicólise e fornece o combustível necessário para a resposta de luta ou fuga.

A conversão gliconeogênica do piruvato em fosfoenolpiruvato está sob múltiplos tipos de regulação

Na via do piruvato à glicose, o primeiro ponto de controle determina o destino do piruvato na mitocôndria: sua conversão em acetil-CoA (pelo complexo da piruvato-desidrogenase) para suprir o ciclo do ácido cítrico (Capítulo 16) ou em oxalacetato (pela piruvato-carboxilase) para iniciar o processo de gliconeogênese (**Figura 15-22**). Quando os ácidos graxos estão disponíveis como combustíveis, sua degradação nas mitocôndrias do fígado gera acetil-CoA, sinal de que não é necessária oxidação adicional de glicose para combustível. A acetil-CoA é um modulador alostérico positivo da piruvato-carboxilase e negativo da piruvato-desidrogenase, por meio de uma proteína-cinase que inativa a desidrogenase. Quando as necessidades energéticas da célula estão satisfeitas, a fosforilação oxidativa é reduzida, a concentração de NADH aumenta em relação à de NAD^+ e inibe o ciclo do ácido cítrico, e a acetil-CoA se acumula. A concentração aumentada da acetil-CoA inibe o complexo da piruvato-desidrogenase, diminuindo a formação de acetil-CoA a partir de piruvato, e estimula a gliconeogênese pela ativação da piruvato-carboxilase, permitindo a conversão do excesso de piruvato em oxalacetato (e, eventualmente, em glicose).

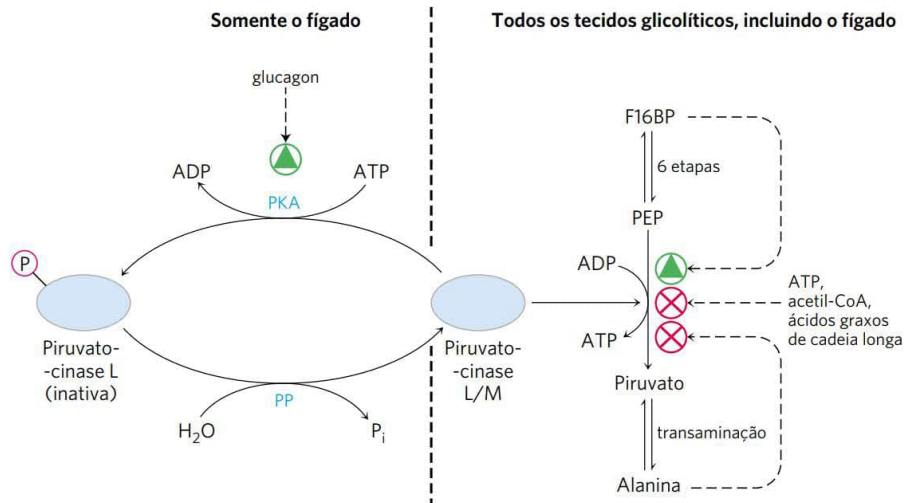


FIGURA 15-21 Regulação da piruvato-cinase. A enzima é inibida alostericamente por ATP, acetil-CoA e ácidos graxos de cadeia longa (sinais de um suprimento abundante de energia), e o acúmulo de frutose-1,6-bisfosfato desencadeia sua ativação. O acúmulo de alanina, que é sintetizada a partir do piruvato em uma única etapa, inibe alostericamente a piruvato-cinase, reduzindo a velocidade de produção de piruvato na glicólise. A isoenzima do fígado (forma L) também é regulada hormonalmente. O glucagon ativa a proteína-quinase dependente de AMP cíclico (PKA; ver Figura 15-37), que fosforila a isoenzima L da piruvato-cinase, inativando-a. Quando os níveis de glucagon diminuem, uma proteína-fosfatase (PP) desfosforila a piruvato-cinase, ativando-a. Esse mecanismo impede que o fígado degrade glicose pela glicólise quando a glicose sanguínea estiver baixa; em vez disso, o fígado exporta glicose. A isoenzima do músculo (forma M) não é afetada por esse mecanismo de fosforilação.

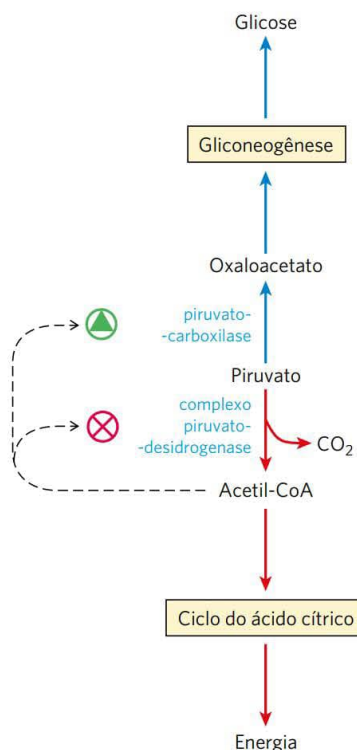


FIGURA 15-22 Dois destinos alternativos para o piruvato. O piruvato pode ser convertido em glicose e glicogênio via gliconeogênese, ou oxidado a acetil-CoA para a produção de energia. A primeira enzima de cada via é regulada alostericamente; a acetil-CoA, produzida tanto pela oxidação dos ácidos graxos como pelo complexo da piruvato-desidrogenase, estimula a piruvato-carboxilase e inibe a piruvato-desidrogenase.

O oxalacetato assim formado é convertido em fosfoenolpiruvato (PEP) na reação catalisada pela PEP-carboxicinas (Figura 15-13). Nos mamíferos, a regulação dessa enzima-chave ocorre principalmente no nível de sua síntese e degradação, em resposta a sinais hormonais e dietéticos. O jejum ou níveis elevados de glucagon agem por meio do cAMP para aumentar a taxa de transcrição e estabilizar o mRNA. A insulina e a glicose sanguínea alta têm efeitos opostos. Discute-se adiante a regulação transcricional com mais detalhes. Essas mudanças, geralmente desencadeadas por um sinal de fora da célula (dieta, hormônios), acontecem em escala de tempo de minutos ou horas.

A regulação transcricional da glicólise e da gliconeogênese altera o número de moléculas das enzimas

A maioria das ações reguladoras discutidas até agora é mediada por mecanismos rápidos e reversíveis: efeitos alostéricos, alterações covalentes (fosforilação) da enzima, ou ligação a uma proteína reguladora. Outro conjunto de processos reguladores envolve alterações no número de moléculas de uma enzima na célula por meio de mudanças no equilíbrio entre sua síntese e degradação, e a discussão a seguir tratará da regulação da transcrição por meio de fatores de transcrição ativados por sinais.

No Capítulo 12, foram encontrados receptores nucleares e fatores de transcrição no contexto da sinalização por insulina. Esse hormônio age por meio de seu receptor na membrana plasmática para ativar pelo menos duas vias de sinalização distintas, cada uma envolvendo a ativação de uma proteína-quinase. A MAP-quinase ERK, por exemplo,

fosforila os fatores de transcrição SRF e Elk1 (ver Figura 12-19), os quais estimulam a síntese de enzimas necessárias para o crescimento e a divisão celular. A proteína-cinase B (PKB, também chamada de Akt) fosforila outro conjunto de fatores de transcrição (p. ex., PDX1), que estimulam a síntese de enzimas que metabolizam carboidratos e as gorduras que são formadas e armazenadas em consequência de um excesso de ingestão de carboidratos. Nas células β pancreáticas, a PDX1 também estimula a síntese da própria insulina.

Mais de 150 genes têm sua transcrição regulada pela insulina; os seres humanos têm, pelo menos, sete tipos gerais de elementos de resposta à insulina, cada um deles reconhecido por um subconjunto de fatores de transcrição ativados pela insulina sob condições variadas. A insulina estimula a transcrição dos genes que codificam as hexocinases II e IV, a PFK-1, a piruvato-cinase e a PFK-2/FBPase-2 (todas envolvidas na glicólise e na sua regulação); várias enzimas da síntese dos ácidos graxos; a glicose-6-fosfato-desidrogenase e a 6-fosfogliconato-desidrogenase, que são enzimas da via das pentoses-fosfato que geram o NADPH requerido para a síntese dos ácidos graxos. A insulina também reduz a expressão dos genes que codificam duas enzimas da gliconeogênese: PEP-carboxicinas e glicose-6-fosfatase (Tabela 15-5). Essas alterações têm os efeitos de (1) estimular reações que consomem glicose (síntese de glicogênio, de ácidos graxos e de triacilgliceróis) e (2) inibir a produção e a liberação de glicose a partir do fígado para o sangue.

Um fator de transcrição importante para o metabolismo dos carboidratos é a **ChREBP (proteína de ligação ao elemento de resposta aos carboidratos**, [do inglês, *carbohydrate response element binding protein*]; **Figura 15-23**), expressa principalmente no fígado, no tecido adi-

poso e no rim. Ela coordena a síntese de enzimas necessárias para a síntese de carboidratos e de lipídeos. No seu estado inativo, a ChREBP é fosforilada e se localiza no citosol. Quando a fosfoproteína-fosfatase PP2A (Figura 15-20) remove um grupo fosforila da ChREBP, esse fator de transcrição pode entrar no núcleo. Ali, a PP2A nuclear remove outro grupo fosforila, e o fator se liga a uma proteína, Mlx, ativando a síntese de várias enzimas: piruvato-cinase, ácido graxo-sintase e acetil-CoA-carboxilase, a primeira enzima da via da síntese dos ácidos graxos.

A xilulose-5-fosfato, que controla a atividade da PP2A – e, em última análise, a síntese desse grupo de enzimas metabólicas – é um intermediário da via das pentoses-fosfato (Figura 14-23). Quando a concentração da glicose no sangue está alta, ela entra no fígado e é fosforilada pela hexocinase IV. A glicose-6-fosfato assim formada pode entrar ou na via glicolítica ou na via das pentoses-fosfato. Nesta última, duas oxidações iniciais produzem a xilulose-5-fosfato, a qual serve como um sinal de que as vias de utilização da glicose estão bem supridas de substrato. Isso é obtido pela ativação alostérica da PP2A, a qual desfosforila a ChREBP, permitindo ao fator de transcrição a estimulação da expressão de genes das enzimas da glicólise e da síntese de gorduras (Figura 15-23).

A glicólise gera piruvato, e a conversão do piruvato em acetil-CoA fornece o material de partida para a síntese dos ácidos graxos: a acetil-CoA-carboxilase converte acetil-CoA em malonil-CoA, o primeiro intermediário comprometido com a via de síntese dos ácidos graxos. O complexo da ácido graxo-sintase produz ácidos graxos que são exportados para o tecido adiposo e armazenados na forma de triacilgliceróis (Capítulo 21). Dessa maneira, o excesso de carboidrato da dieta é armazenado como gordura.

TABELA 15-5 Alguns dos muitos genes regulados pela insulina

Alteração na expressão gênica	Papel no metabolismo da glicose
Expressão aumentada	
Hexocinase II	Essencial para a glicólise, que consome glicose para produzir energia
Hexocinase IV	
Fosfofrutocinase I (PFK-1)	
PFK-2/FBPase-2	
Piruvato-cinase	
Glicose-6-fosfato-desidrogenase	Produz NADPH, que é essencial para a conversão de glicose em lipídeos
6-Fosfogliconato-desidrogenase	
Enzima málica	
ATP-citrato-liase	Produz acetil-CoA, que é essencial para a conversão de glicose em lipídeos
Piruvato-desidrogenase	
Acetil-CoA-carboxilase	Essencial para a conversão de glicose em lipídeos
Complexo da ácido graxo-sintase	
Estearoil-CoA-desidrogenase	
Acil-CoA-glicerol-transferases	
Expressão reduzida	
PEP-carboxicinas	Essencial para a produção de glicose pela gliconeogênese
Glicose-6-fosfatase (subunidade catalítica)	

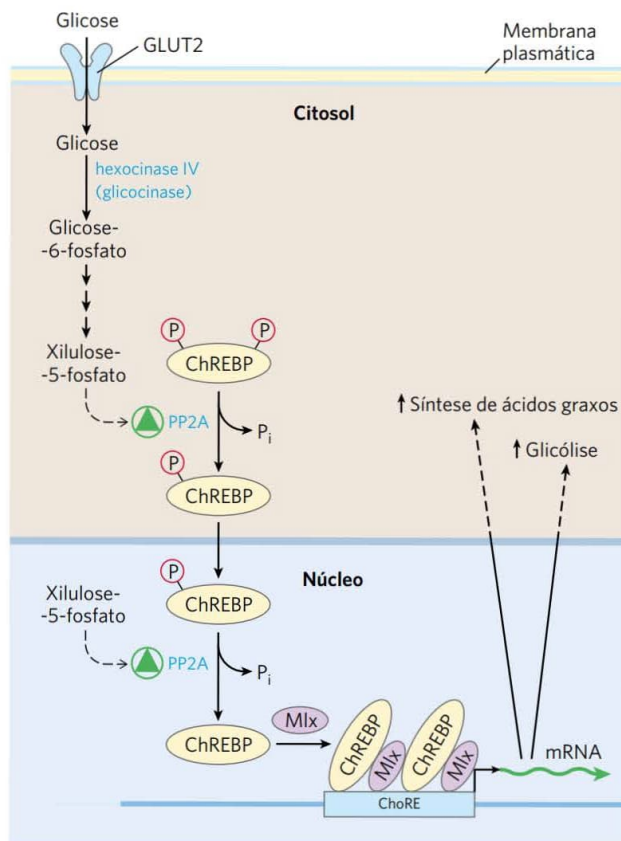


FIGURA 15-23 Mecanismo de regulação gênica pelo fator de transcrição ChREBP. Quando um fator ChREBP é fosforilado em um resíduo de Ser e um de Thr no citosol de um hepatócito, ele não pode entrar no núcleo. A desfosforilação de P-Ser pela proteína-fosfatase PP2A permite que ChREBP entre no núcleo, onde uma segunda desfosforilação, de P-Thr, ativa o fator, de forma que ele consiga se associar com a proteína Mlx. ChREBP-Mlx liga-se, agora, ao elemento de resposta aos carboidratos (ChoRE) no promotor e estimula a transcrição. A PP2A é ativada alostericamente pela xilulose-5-fosfato, um intermediário da via das pentoses-fosfato.

Outro fator de transcrição no fígado, **SREBP-1c**, membro da família das **proteínas de ligação ao elemento regulador dos esteróis (SREBP)** (do inglês, *sterol regulatory element binding protein*) (ver Figura 21-44), ativa a síntese das enzimas piruvato-cinase, hexocinase IV, lipase lipoproteica, acetil-CoA-carboxilase e do complexo da ácido graxo-sintase, que converte a acetil-CoA (produzida a partir do piruvato) em ácidos graxos para o armazenamento nos adipócitos. A síntese da SREBP-1c é estimulada pela insulina e inibida pelo glucagon. A SREBP-1c também reprime a expressão de várias enzimas gliconeogênicas: glicose-6-fosfatase, PEP-carboxicinas e FBPase-1.

O fator de transcrição **CREB** (**proteína de ligação ao elemento de resposta ao cAMP** [do inglês, *cyclic AMP response element binding protein*]) ativa a síntese da glicose-6-fosfatase e da PEP-carboxicinas em resposta ao aumento da [cAMP], desencadeado pelo glucagon. Em contrapartida, a **inativação** de outros fatores de transcri-

ção estimulada pela insulina inibe a síntese de várias enzimas gliconeogênicas no fígado: PEP-carboxicinas, frutose-1,6-bisfosfatase, transportador da glicose-6-fosfato do retículo endoplasmático e a glicose-6-fosfatase. Por exemplo, **FOXO1** (do inglês, *forkhead box other*) estimula a síntese das enzimas gliconeogênicas e reprime a síntese das enzimas da glicólise, da via das pentoses-fosfato e da síntese dos triacilgliceróis (**Figura 15-24**). Na sua forma não fosforilada, FOXO1 age como um fator de transcrição nuclear. Em resposta à insulina, esse fator deixa o núcleo e, no citosol, é fosforilado pela PKB, sendo marcado com ubiquitina e degradado no proteassomo. O glucagon impede a fosforilação pela PKB, e FOXO1 permanece ativo no núcleo.

Embora os processos descritos anteriormente pareçam complicados, a regulação dos genes que codificam as enzimas do metabolismo dos carboidratos e das gorduras vem a ser muito mais complexa e aprimorada do que aparece aqui. Múltiplos fatores de transcrição podem agir sobre um mesmo promotor; múltiplas proteínas-cinase e fosfatases podem ativar ou inativar esses fatores; e uma grande variedade de fatores acessórios proteicos modula a atividade dos fatores de transcrição. Essa complexidade pode ser evidenciada, por exemplo, no gene que codifica a PEP-carboxicinas, um caso de controle transcricional muito bem estudado. Sua região promotora (**Figura 15-25**) tem mais de 15 elemen-

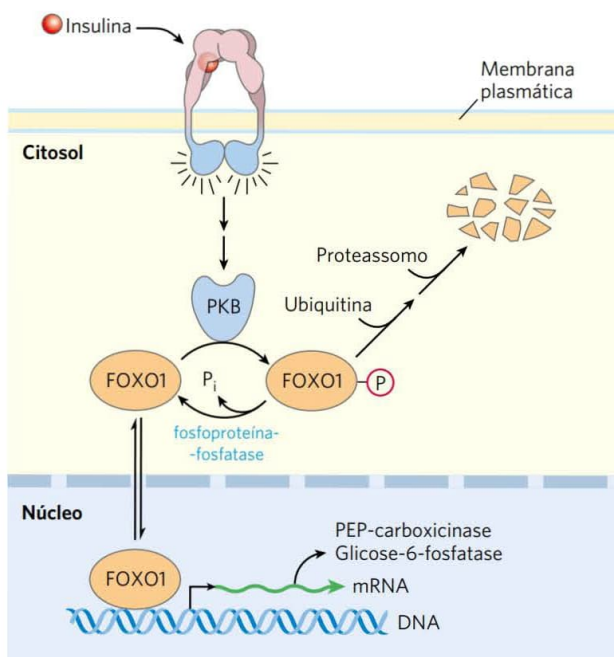


FIGURA 15-24 Mecanismo de regulação gênica pelo fator de transcrição FOXO1. A insulina ativa a cascata de sinalização mostrada na Figura 12-20, levando à ativação da proteína-cinase B (PKB). FOXO1 é fosforilado pela PKB no citosol, e o fator fosforilado é marcado pela adição de ubiquitinas para degradação no proteassomo. O FOXO1 que permanece não fosforilado, ou que é desfosforilado, entra no núcleo, liga-se a um elemento de resposta e desencadeia a transcrição dos genes associados. Assim, a insulina tem o efeito de “desligar” a expressão desses genes, os quais incluem a PEP-carboxicinas e a glicose-6-fosfatase.

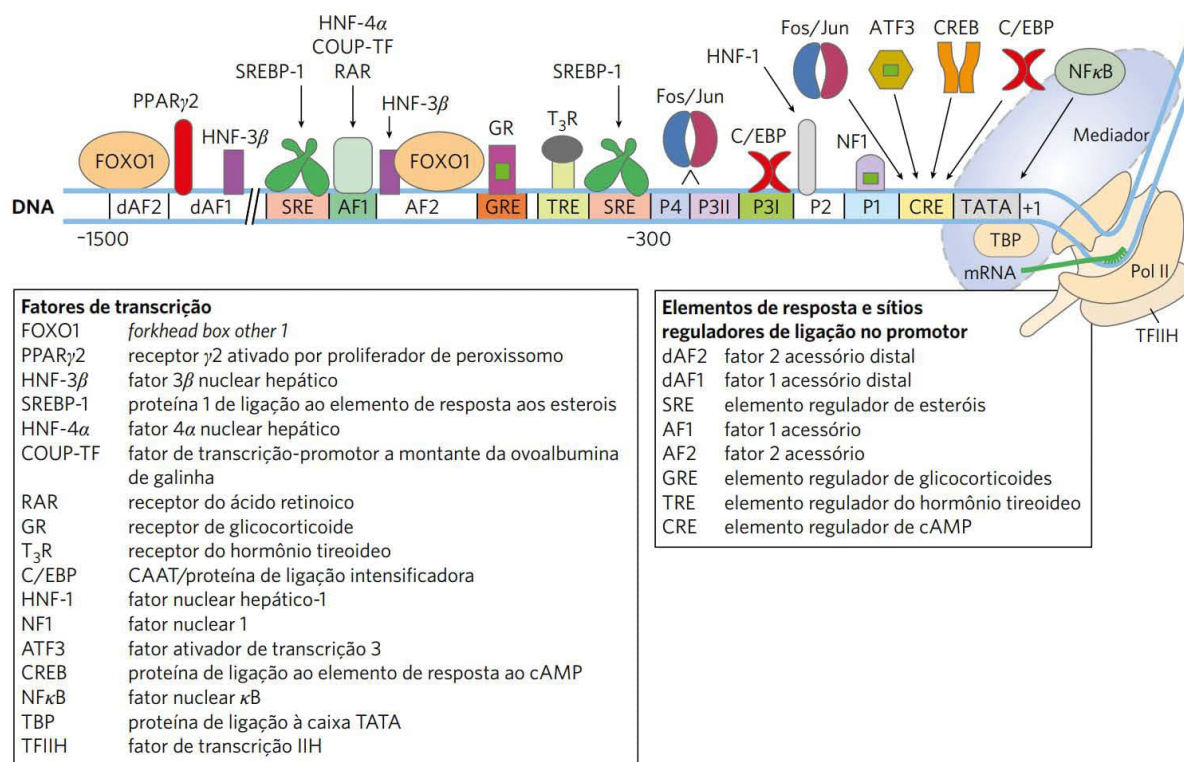


FIGURA 15-25 A região promotora do gene da PEP-carboxicinas, mostrando a complexidade da regulação desse gene. Este diagrama mostra os fatores de transcrição (os ícones menores, ligados ao DNA) relacionados com a regulação da transcrição do gene da PEP-carboxicinas. O nível de expressão desse gene depende de sinais combinados que afetam todos estes fatores, que podem refletir a disponibilidade de nutrientes, o nível de glicose sanguínea e outras circunstâncias que afetam a necessidade da célula por essa enzima em um período em particular. P1, P2, P3I, P3II e P4 são sítios de ligação a proteínas, identificados por testes de *footprinting* com DNase I (ver Quadro 26-1). A caixa TATA é o ponto de montagem do complexo de transcrição da RNA-polimerase II (Pol II). [Fonte: informação obtida de K. Chakravarty, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 40:129, 2005, Fig. 2.]

tos de resposta que são reconhecidos por, pelo menos, uma dúzia de fatores de transcrição conhecidos, e com provavelmente mais a serem descobertos. Os fatores de transcrição agem em associação sobre esta região promotora, e, em centenas de outros promotores, para regular de forma mais exata os níveis de centenas de enzimas metabólicas, coordenando suas atividades no metabolismo dos carboidratos e

das gorduras. A importância crucial dos fatores de transcrição na regulação metabólica se torna clara pela observação dos efeitos de mutações nesses genes. Por exemplo, pelo menos cinco tipos diferentes de diabetes juvenil iniciado na maturidade (MODY, do inglês, *maturity-onset diabetes of the young*) são associados com mutações em fatores de transcrição específicos (Quadro 15-3).

QUADRO 15-3



MEDICINA

Mutações genéticas que originam formas raras de diabetes

O termo “diabetes” descreve grande variedade de condições clínicas que têm em comum a produção excessiva de urina. O Quadro 11-1 descreve o diabetes insípido, no qual a deficiência na reabsorção de água pelos rins é resultado de uma mutação no gene da aquaporina. O “diabetes melito” refere-se especificamente à doença na qual a metabolização da glicose está comprometida, seja devido à incapacidade do pâncreas de produzir insulina ou à resistência dos tecidos à ação da insulina.

Existem dois tipos comuns de diabetes melito. O tipo 1, também chamado de diabetes melito dependente de insulina (DMDI), é causado por um ataque autoimune às células

das β -pancreáticas produtoras de insulina. As pessoas com DMDI devem usar insulina injetável ou por inalação para compensar a perda das células β . O DMDI desenvolve-se na infância ou na adolescência; um nome mais antigo da doença é diabetes juvenil. O tipo 2, também chamado de diabetes melito não dependente de insulina (DMNDI), geralmente se desenvolve em adultos com mais de 40 anos. É muito mais comum do que o DMDI, e sua ocorrência na população está fortemente relacionada com a obesidade. A atual epidemia de obesidade nos países mais desenvolvidos traz com ela o presságio de uma epidemia de DMNDI, proporcionando um forte incentivo para o estudo

(Continua)

QUADRO 15-3



MEDICINA

Mutações genéticas que originam formas raras de diabetes (*Continuação*)

das relações entre a obesidade e o desencadeamento do DMNDI nos níveis genético e bioquímico. Após completar o exame do metabolismo das gorduras e das proteínas nos próximos capítulos, será retomada (Capítulo 23) a discussão sobre diabetes, que tem um amplo efeito no metabolismo dos carboidratos, das gorduras e das proteínas.

Aqui, consideramos outro tipo de diabetes, no qual o metabolismo dos carboidratos e dos lipídeos está perturbado: o diabetes juvenil com início na maturidade (MODY), no qual uma mutação genética afeta um fator de transcrição importante na transmissão do sinal da insulina para o núcleo, ou afeta uma enzima que responde à insulina. No MODY2, uma mutação no gene da hexocinase IV (glicocinase) afeta o fígado e o pâncreas, órgãos nos quais esta é a principal isoforma da hexocinase. A glicocinase das células β -pancreáticas funciona como sensor de glicose. Em geral, quando a glicose sanguínea aumenta, aumentam também seus níveis nas células β , sendo que, uma vez que a glicocinase tem uma K_m relativamente alta para a glicose, sua atividade aumenta com a elevação dos níveis de glicose no sangue. O metabolismo da glicose-6-fosfato formada nessa reação eleva o nível de ATP nas células β , o que causa a liberação de insulina pelo mecanismo mostrado na Figura 23-28. Em pessoas saudáveis, a concentração sanguínea de glicose de cerca de 5 mM causa essa liberação de insulina, porém pessoas com mutações que inativam ambas as cópias do gene da glicocinase têm limiares muito altos para a liberação da insulina, e, em consequência, apresentam hiperglicemia grave desde o nascimento – diabetes neonatal permanente. Em indivíduos com uma cópia normal e uma cópia mutada do gene da glicocinase, o limiar para que a glicose determine a liberação de insulina aumenta para cerca de 7 mM. Como resultado, esses indivíduos apresentam glicemia apenas ligeiramente acima do normal: em geral, eles têm hiperglicemia leve e não apresentam sintomas. Essa condição (MODY2) geralmente é descoberta por acaso durante análise rotineira de glicose sanguínea.

Existem pelo menos outros cinco tipos de MODY, cada um deles como resultado de mutações que inativam algum dos fatores de transcrição essenciais para o desenvolvimento normal e a função das células β -pancreáticas. As pessoas com essas mutações apresentam redução na produção de insulina e defeitos associados à homeostasia da glicose sanguínea em graus variados. Em MODY1 e MODY3, os defeitos são suficientemente graves para produzir as complicações de longo prazo associadas com DMNDI e DMNDI – problemas cardiovasculares, insuficiência renal e cegueira. MODY4, 5 e 6 são formas menos graves da doença. Em conjunto, as doenças MODY representam uma pequena porcentagem de casos de DMNDI. Pessoas com mutações no próprio gene da insulina também são casos muito raros; elas apresentam defeitos de gravidade variada na sinalização da insulina.

RESUMO 15.3 Regulação coordenada da glicólise e da gliconeogênese

- A gliconeogênese e a glicólise compartilham sete enzimas que catalisam as reações livremente reversíveis das vias. Nas outras três etapas, as reações direta e inversa são catalisadas por enzimas diferentes, e esses são os pontos de regulação das duas vias.
- A hexocinase IV (glicocinase) tem propriedades cinéticas relacionadas com seu papel especial no fígado: liberar glicose para o sangue quando a glicose sanguínea está baixa, além de captar e metabolizar a glicose quando ela estiver alta no sangue.
- A PFK-1 é inibida alostericamente por ATP e citrato. Na maioria dos tecidos dos mamíferos, incluindo o fígado, a frutose-2,6-bisfosfato é um ativador alostérico dessa enzima.
- A piruvato-cinase é inibida alostericamente por ATP, e a isoenzima do fígado também é inibida por fosforilação dependente de cAMP.
- A gliconeogênese é regulada no nível da piruvato-carboxilase (ativada por acetil-CoA) e da FBPase-1 (inibida por frutose-2,6-bisfosfato e AMP).
- Para limitar a alternância de fluxo de substrato entre a glicólise e a gliconeogênese, as duas vias estão sob controle alostérico recíproco, obtido principalmente pelos

efeitos opostos da frutose-2,6-bisfosfato sobre a PFK-1 e a FBPase-1.

- O glucagon ou a adrenalina reduzem a [frutose-2,6-bisfosfato] pela elevação da [cAMP] e a promoção da fosforilação da enzima bifuncional PFK-2/FBPase-2. A insulina aumenta a [frutose-2,6-bisfosfato] pela ativação da fosfoproteína-fosfatase que desfosforila e, assim, ativa a PFK-2.
- A xilulose-5-fosfato, um intermediário da via das pentoses-fosfato, ativa a fosfoproteína-fosfatase PP2A, que desfosforila várias proteínas-alvo, incluindo PFK-2/FBPase-2, deslocando o equilíbrio no sentido da captação de glicose, síntese de glicogênio e síntese de lipídeos no fígado.
- Fatores de transcrição, incluindo ChREBP, CREB, SREBP e FOXO1, agem no núcleo, na regulação da expressão de genes específicos que codificam enzimas das vias glicolítica e gliconeogênica. A insulina e o glucagon atuam antagonicamente na ativação desses fatores, ligando e desligando, dessa forma, um grande número de genes.

15.4 Metabolismo do glicogênio nos animais

A presente discussão sobre a regulação metabólica, usando o metabolismo dos carboidratos como principal exemplo, aborda agora a síntese e a degradação do glicogênio. Esta

seção focaliza as vias metabólicas; a Seção 15.5 aborda os mecanismos reguladores.

O excesso de glicose é convertido em formas poliméricas de armazenamento – glicogênio nos vertebrados e em muitos microrganismos, amido nas plantas. Nos vertebrados, o glicogênio pode representar até 10% do peso do fígado e 1 a 2% do peso do músculo. Se toda essa glicose fosse dissolvida no citosol de um hepatócito, sua concentração seria de cerca de 0,4 M, suficiente para influenciar nas propriedades osmóticas da célula. Quando armazenada na forma de um grande polímero (glicogênio), contudo, a mesma massa de glicose tem uma concentração de apenas 0,01 μ M. O glicogênio é armazenado em grandes grânulos citosólicos. A partícula básica do glicogênio, a partícula β , tem um diâmetro de cerca de 21 nm e consiste em até 55.000 resíduos de glicose com cerca de 2.000 extremidades não redutoras. De 20 a 40 dessas partículas se agrupam para formar as rosetas α , visíveis ao microscópio eletrônico em amostras de tecidos de animais bem alimentados (**Figura 15-26**), mas praticamente ausentes após um jejum de 24 horas.

O glicogênio do músculo fornece uma fonte de energia rápida para os metabolismos aeróbico e anaeróbico. O glicogênio muscular pode ser gasto em menos de uma hora durante atividade intensa. O glicogênio hepático serve como um reservatório de glicose para os outros tecidos quando não há glicose da dieta disponível (entre as refeições ou no jejum); isso é especialmente importante para os neurônios do encéfalo, que não podem usar ácidos graxos como combustível. O glicogênio do fígado pode ser exaurido em 12 a 24 horas. Nos seres humanos, a quantidade total de energia armazenada na forma de glicogênio é muito menor do que a quantidade armazenada como gordura (triacilglicerol) (ver Tabela 23-6), mas as gorduras, nos vertebrados, não podem ser convertidas em glicose e não podem ser metabolizadas anaerobicamente.

Os grânulos de glicogênio são agregados complexos de glicogênio mais as enzimas que o sintetizam e degradam, assim como a maquinaria de regulação dessas enzimas.

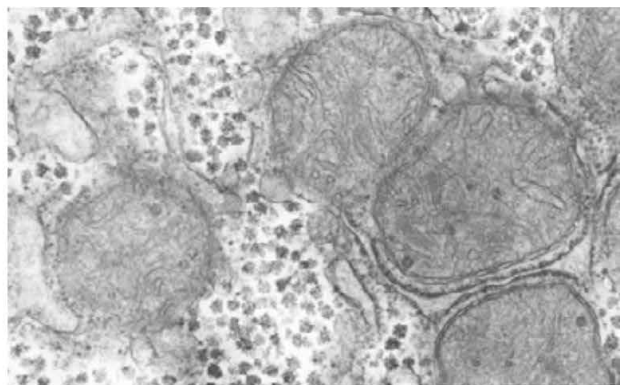


FIGURA 15-26 Grânulos de glicogênio em um hepatócito. Os grânulos de glicogênio aparecem como partículas eletronicamente densas, com frequência em agregados ou rosetas associados a túbulos do retículo endoplasmático liso. Cinco mitocôndrias também são evidentes nesta micrografia. [Fonte: BCC Microimaging. Reproduzida com permissão.]

Os mecanismos gerais de armazenamento e mobilização do glicogênio são os mesmos no músculo e no fígado, porém as enzimas diferem em aspectos sutis, mas importantes, que refletem os papéis diferentes do glicogênio nesses dois tecidos. O glicogênio também é obtido da dieta e degradado no intestino, o que envolve um conjunto separado de enzimas hidrolíticas que convertem glicogênio em glicose livre. (O amido da dieta é hidrolisado de forma semelhante.) A presente discussão se inicia com a degradação do glicogênio em glicose-1-fosfato (**glicogenólise**) e, em seguida, aborda a sua síntese (**glicogênese**).

A degradação do glicogênio é catalisada pela glicogênio-fosforilase

No músculo esquelético e no fígado, as unidades de glicose das ramificações externas do glicogênio entram na via glicolítica pela ação de três enzimas: glicogênio-fosforilase, enzima de desramificação do glicogênio e fosfoglicomutase. A glicogênio-fosforilase catalisa a reação na qual uma ligação glicosídica ($\alpha 1 \rightarrow 4$) entre dois resíduos de glicose em uma extremidade não redutora do glicogênio é atacada por um fosfato inorgânico (P_i), removendo o resíduo terminal na forma de **α -D-glicose-1-fosfato** (**Figura 15-27**). Essa reação de *fosforólise* é diferente da *hidrólise* das ligações glicosídicas pela amilase durante a degradação intestinal do glicogênio e do amido da dieta. Na fosforólise, parte da energia da ligação glicosídica é preservada pela formação do éster de fosfato, glicose-1-fosfato (ver Seção 14.2).

O piridoxal-fosfato é um cofator essencial na reação da glicogênio-fosforilase; seu grupo fosfato atua como catalisador ácido geral, promovendo o ataque pelo P_i sobre a ligação glicosídica. (Esse papel do piridoxal-fosfato é incomum; seu papel mais característico é o de cofator no metabolismo dos aminoácidos; ver Figura 18-6.)

A glicogênio-fosforilase age repetidamente sobre as extremidades não redutoras das ramificações do glicogênio até que alcance um ponto a quatro resíduos de glicose de um ponto de ramificação ($\alpha 1 \rightarrow 6$) (ver Figura 7-13), onde sua ação é interrompida. A degradação pela glicogênio-fosforilase continua somente depois que a **enzima de desramificação**, conhecida formalmente como **oligo ($\alpha 1 \rightarrow 6$)-glicano-transferase**, catalisa duas reações sucessivas que removem as ramificações (**Figura 15-28**). Logo que as ramificações são transferidas e o resíduo glicosila na posição C-6 é hidrolisado, a atividade da glicogênio-fosforilase pode continuar.

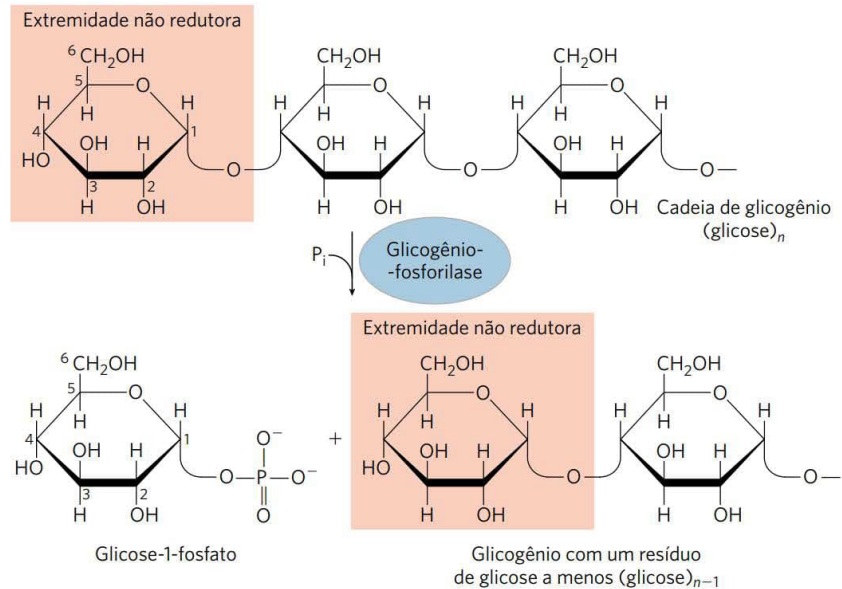
A glicose-1-fosfato pode entrar na glicólise ou, no fígado, ser usada para repor a glicose sanguínea

A glicose-1-fosfato, o produto da reação da glicogênio-fosforilase, é convertida em glicose-6-fosfato pela **fosfoglicomutase**, que catalisa a reação reversível



A enzima, inicialmente fosforilada em um resíduo de Ser, doa um grupo fosforila ao C-6 do substrato e aceita um grupo fosforila do C-1 (**Figura 15-29**).

FIGURA 15-27 Remoção, pela glicogênio-fosforilase, de um resíduo de glicose da extremidade não redutora de uma cadeia de glicogênio. Este processo é repetitivo; a enzima remove sucessivos resíduos de glicose até que alcance a quarta unidade de glicose antes de um ponto de ramificação (ver Figura 15-28).



A glicose-6-fosfato formada no músculo esquelético a partir do glicogênio pode entrar na glicólise e serve como fonte de energia para a contração muscular. No fígado, a degradação do glicogênio serve a um propósito diferente: liberar glicose para o sangue quando o nível de glicose sanguínea diminui, como acontece entre as refeições. Isso requer a ação da enzima glicose-6-fosfatase, presente

no fígado e no rim, mas não em outros tecidos. A enzima é uma proteína integral da membrana do retículo endoplasmático, e se prevê que contenha nove hélices transmembrana, com o sítio ativo no lado luminal do retículo. A glicose-6-fosfato formada no citosol é transportada para o lúmen do retículo por um transportador específico (T1) (Figura 15-30) e hidrolisada na superfície luminal pela glicose-6-fosfatase. Acredita-se que os produtos resultantes, P_i e glicose, sejam transportados de volta para o citosol por dois transportadores diferentes (T2 e T3), e a glicose deixa o hepatócito pelo transportador GLUT2 na membrana plasmática. Observe que, por ter o sítio ativo da enzima glicose-6-fosfatase no lúmen do retículo, a célula separa essa reação do processo de glicólise que ocorre no citosol e poderia ser abortado pela ação da glicose-6-fosfatase. Defeitos genéticos na glicose-6-fosfatase ou no T1 levam a perturbações sérias no metabolismo do glicogênio, resultando na doença de armazenamento de glicogênio tipo Ia (Quadro 15-4).

O músculo e o tecido adiposo não conseguem converter a glicose-6-fosfato formada pela degradação do glicogênio em glicose, pois não têm a enzima glicose-6-fosfatase; por isso, esses tecidos não fornecem glicose para o sangue.

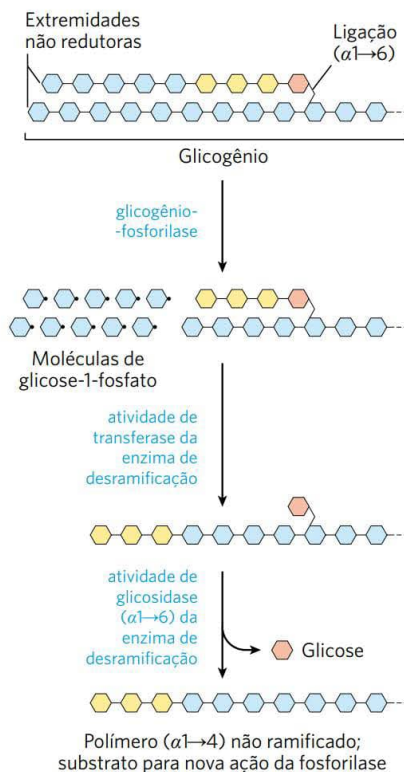


FIGURA 15-28 Degradação do glicogênio próximo a um ponto de ramificação $(\alpha 1 \rightarrow 6)$. Seguindo-se à remoção sequencial dos resíduos terminais de glicose pela glicogênio-fosforilase (ver Figura 15-27), os resíduos próximos a uma ramificação são removidos por um processo em duas etapas que requer a enzima de desramificação bifuncional. Na primeira etapa, a atividade de transferência da enzima transfere um bloco de três resíduos de glicose da ramificação para uma extremidade não redutora próxima, à qual o segmento é religado por uma ligação $(\alpha 1 \rightarrow 4)$. O resíduo remanescente no ponto de ramificação, em ligação $(\alpha 1 \rightarrow 6)$, é então liberado como glicose livre pela atividade de glicosidase $(\alpha 1 \rightarrow 6)$ da enzima de desramificação. Os resíduos de glicose são mostrados na forma condensada que omite os grupos $-H$, $-OH$ e $-CH_2OH$ dos anéis piranosídicos.

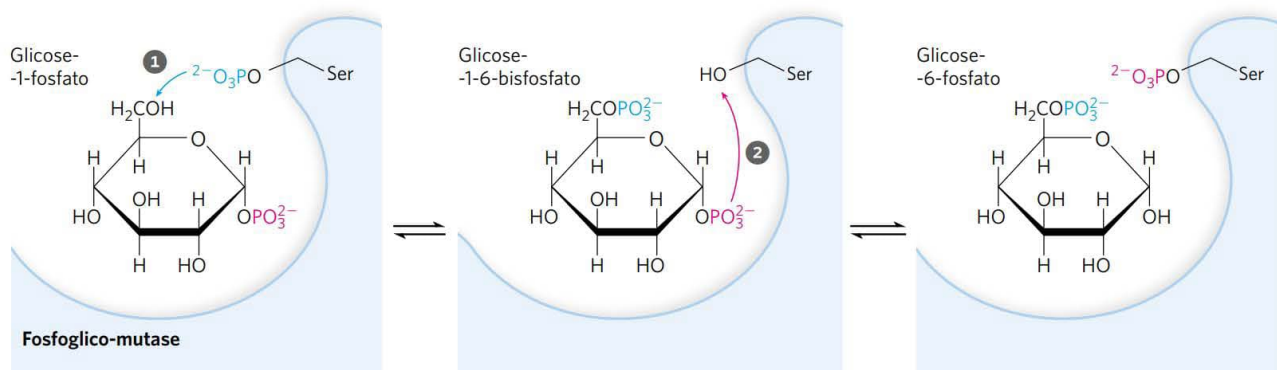


FIGURA 15-29 A reação catalisada pela fosfoglicomutase. A reação começa com a enzima fosforilada em um resíduo de Ser. Na etapa 1, a enzima doa seu grupo fosforila (em azul) para a glicose-1-fosfato, produzindo glicose-1-6-bisfosfato. Na etapa 2, o grupo fosforila no C-1 da glicose-1-6-bisfosfato (em vermelho) é transferido de volta para a enzima, restaurando a fosfoenzima e produzindo glicose-6-fosfato.

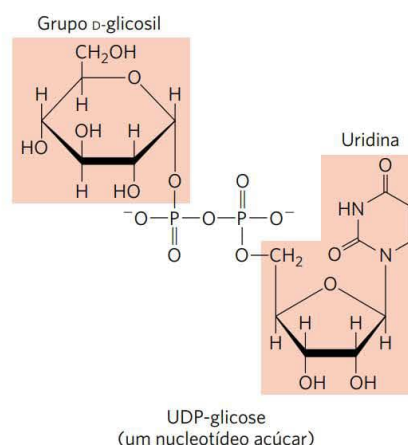
UDP-glicose, um nucleotídeo ligado a um glicídeo, doa glicose para a síntese do glicogênio



Luis Leloir, 1906-1987
[Fonte: AP Photo/John Lindsay.]

Muitas das reações pelas quais as hexoses são transformadas ou polimerizadas envolvem **nucleotídeos-açúcar**, compostos nos quais o carbono anômero do açúcar é ativado pela união a um nucleotídeo por meio de uma ligação éster de fosfato. Os nucleotídeos-açúcar são os substratos para a polimerização de monossacarídeos em dissacarídeos, glicogênio, amido, celulose e polissacarídeos extracelulares mais complexos. Também

são intermediários-chave na produção das amino-hexoses e desóxi-hexoses, encontradas em alguns desses polissacarídeos, e na síntese da vitamina C (ácido L-ascórbico). O papel dos nucleotídeos-açúcar na biossíntese do glicogênio e em muitos outros derivados de carboidratos foi descoberto em 1953 pelo bioquímico argentino Luis Leloir.



A adequação dos nucleotídeos-açúcar para as reações biossintéticas tem origem em várias propriedades:

1. Sua formação é metabolicamente irreversível, contribuindo para a irreversibilidade das vias biossintéticas em que são intermediários. A condensação de um nucleosídeo-trifosfato com uma hexose-1-fosfato

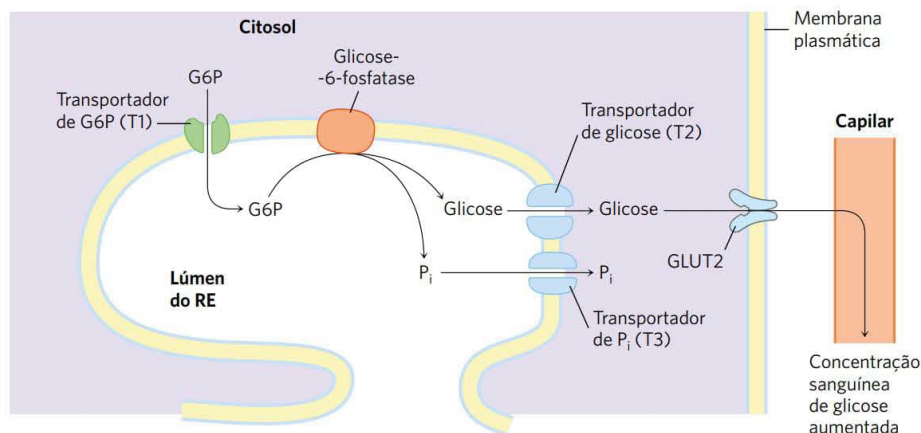


FIGURA 15-30 Hidrólise da glicose-6-fosfato pela glicose-6-fosfatase do retículo endoplasmático (RE). O sítio catalítico da glicose-6-fosfatase está voltado para o lúmen do RE. Um transportador (T1) de glicose-6-fosfato (G6P) leva o substrato do citosol para o lúmen, e os produtos, glicose e P_i, passam para o citosol por meio de transportadores específicos (T2 e T3). A glicose deixa a célula via transportador GLUT2 da membrana plasmática.

QUADRO 15-4 Carl e Gerty Cori: pioneiros no estudo do metabolismo e das doenças do armazenamento do glicogênio

Muito do que está escrito nos livros-texto atuais de bioquímica sobre o metabolismo do glicogênio foi descoberto entre 1925 e 1950 pelo admirável casal Carl F. Cori e Gerty T. Cori. Ambos se formaram em medicina na Europa no final da Primeira Guerra Mundial (ela completou os estudos pré-médicos e a escola de medicina em um ano). Eles deixaram a Europa juntos, em 1922, e estabeleceram laboratórios de pesquisa nos Estados Unidos, primeiro por nove anos em Buffalo, Nova York, onde é hoje o Roswell Park Memorial Institute, e de 1931 até o final de suas vidas, na Universidade de Washington, em St. Louis.

Nos seus estudos fisiológicos iniciais sobre a origem e o destino do glicogênio no músculo dos animais, os Cori demonstraram a conversão do glicogênio em lactato no tecido, o deslocamento do lactato pelo sangue para o fígado e sua reconversão aí em glicogênio – rota que se tornou conhecida como o ciclo de Cori (ver Figura 23-21).

Seguindo essas observações no nível bioquímico, o casal mostrou que o glicogênio era mobilizado em uma reação de fosforólise catalisada pela enzima descoberta por eles, a glicogênio-fosforilase. Os Cori identificaram o produto dessa reação (o “éster de Cori”) como glicose-1-fosfato e mostraram que esse produto podia ser reincorporado em glicogênio pela reação inversa. Embora isso não provasse que essa era a reação usada pelas células para sintetizar glicogênio, foi a primeira demonstração *in vitro* da síntese de uma macromolécula a partir de subunidades monoméricas simples, o que inspirou outros a procurar enzimas polimerizadoras. Arthur Kornberg, descobridor da primeira DNA-polimerase, falou sobre sua experiência no laboratório dos Cori: “Foi a glicogênio-fosforilase, e não o pareamento de bases, que me levou à DNA-polimerase”.



Gerty Cori passou a se interessar por doenças genéticas humanas nas quais o fígado armazenava um excesso de glicogênio. Ela conseguiu identificar o defeito bioquímico de várias dessas doenças e mostrou que elas podiam ser diagnosticadas por meio de testes das enzimas do metabolismo do glicogênio em pequenas amostras de tecidos obtidas por biópsias. A Tabela Q-1 resume o conhecimento atual sobre 13 doenças genéticas desse tipo. ■

Carl e Gerty compartilharam o Prêmio Nobel em Fisiologia ou Medicina em 1947 com Bernardo Houssay, da Argentina, que foi premiado por seus estudos sobre a regulação hormonal do metabolismo dos carboidratos. Os laboratórios Cori em St. Louis se tornaram um centro internacional de pesquisa bioquímica nas décadas de 1940 e 1950, e pelo menos seis cientistas que estudaram com os Cori receberam o Nobel: Arthur Kornberg (pela síntese do DNA, 1959), Severo Ochoa (pela síntese do RNA, 1959), Luis Leloir (pelo papel dos nucleotídeos-açúcar na síntese dos polissacarídeos, 1970), Earl Sutherland (pela descoberta do cAMP na regulação do metabolismo dos carboidratos, 1971), Christian de Duve (pelo fracionamento subcelular, 1974) e Edwin Krebs (pela descoberta da fosforilase-cinase, 1991).



Os Cori no laboratório de Gerty Cori, em torno de 1947.
[Fonte: AP Photo.]

para formar um nucleotídeo-açúcar tem uma pequena variação de energia livre positiva, mas a reação libera PP_i , que é rapidamente hidrolisado pela pirofosfatase inorgânica (**Figura 15-31**), em uma reação fortemente exergônica ($\Delta G^\circ = -19,2 \text{ kJ/mol}$). Isso mantém baixa a concentração de PP_i , garantindo que, na célula, a variação de energia livre real seja vantajosa. De fato, a remoção rápida do produto, favorecida pela grande variação de energia livre negativa da hidrólise de PP_i , impulsiona a reação sintética para a frente, estratégia comum nas reações biológicas de polimerização.

- Embora as transformações químicas dos nucleotídeos-açúcar não envolvam os átomos do próprio nu-

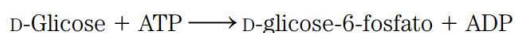
cleotídeo, essa parte da molécula tem muitos grupos que podem interagir covalentemente com enzimas; a energia livre adicional de ligação pode contribuir de modo significativo para a atividade catalítica (Capítulo 6; ver também p. 311).

- Assim como o fosfato, o grupo nucleotídico (p. ex., UMP ou AMP) é um excelente grupo de eliminação, facilitando o ataque nucleofílico pela ativação do carbono do açúcar ao qual está ligado.
- Pela “marcação” de algumas hexoses com grupos nucleotídico, as células podem deixá-las confinadas em um reservatório para determinada finalidade (p. ex., síntese de glicogênio), separadas das hexoses-fosfato destinadas a outra finalidade (como a glicólise).

TABELA Q-1 Doenças do armazenamento de glicogênio em seres humanos

Tipo (nome)	Enzima afetada	Principal órgão/células afetado(as)	Sintomas
Tipo 0	Glicogênio-sintase	Fígado	Glicose sanguínea baixa, corpos cetônicos altos, morte prematura
Tipo Ia (von Gierke)	Glicose-6-fosfatase	Fígado	Fígado aumentado (hepatomegalia), insuficiência renal
Tipo Ib	Glicose-6-fosfato-translocase microssômica	Fígado	Como em Ia; também suscetibilidade alta a infecções bacterianas
Tipo Ic	Transportador microssômico de P _i	Fígado	Como em Ia
Tipo II (Pompe)	Glicosidase lisossômica	Músculo cardíaco e esquelético	Forma infantil: morte aos 2 anos; forma juvenil: defeitos musculares (miopatia); forma adulta: como na distrofia muscular
Tipo IIIa (Cori ou Forbes)	Enzima de desramificação	Fígado, músculos cardíaco e esquelético	Hepatomegalia em crianças; miopatia
Tipo IIIb	Enzima de desramificação hepática (enzima normal no músculo)	Fígado	Hepatomegalia em crianças
Tipo IV (Andersen)	Enzima de ramificação	Fígado, músculo esquelético	Fígado e baço aumentados, mioglobina na urina
Tipo V (McArdle)	Fosforilase muscular	Músculo esquelético	Cãibras induzidas por exercício e dor; mioglobina na urina
Tipo VI (Hers)	Fosforilase hepática	Fígado	Hepatomegalia
Tipo VII (Tarui)	PFK-1 muscular	Músculo, eritrócitos	Como no tipo V; também anemia hemolítica
Tipos VIb, VIII ou IX	Fosforilase-cinase	Fígado, leucócitos, músculo	Hepatomegalia
Tipo XI (Fanconi-Bickel)	Transportador de glicose (GLUT2)	Fígado	Deficiência no desenvolvimento, hepatomegalia, raquitismo, disfunção renal

A síntese do glicogênio ocorre em quase todos os tecidos animais, mas é especialmente proeminente no fígado e no músculo esquelético. O ponto de partida para a síntese do glicogênio é a glicose-6-fosfato. Como foi visto, esta pode ser derivada da glicose livre em uma reação catalisada pelas isoenzimas hexocinases I e II no músculo e hexocinase IV (glicocinase) no fígado:



No entanto, parte da glicose ingerida toma uma via mais indireta para o glicogênio. Ela é captada primeiro pelos eritrócitos e transformada glicoliticamente em lactato, que é captado pelo fígado e convertido em glicose-6-fosfato pela gliconeogênese.

Para iniciar a síntese do glicogênio, a glicose-6-fosfato é convertida em glicose-1-fosfato na reação da fosfoglicomutase:

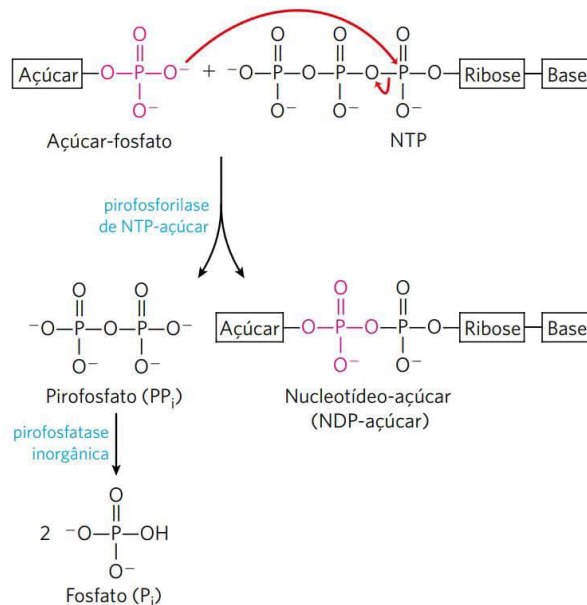


O produto dessa reação é convertido em UDP-glicose pela ação da **UDP-glicose-pirofosforilase**, em uma etapa fundamental da biossíntese do glicogênio:



Observe que essa enzima é denominada pela reação inversa; na célula, a reação ocorre no sentido da formação da UDP-glicose, porque o pirofosfato é hidrolisado rapidamente pela pirofosfatase inorgânica (Figura 15-31).

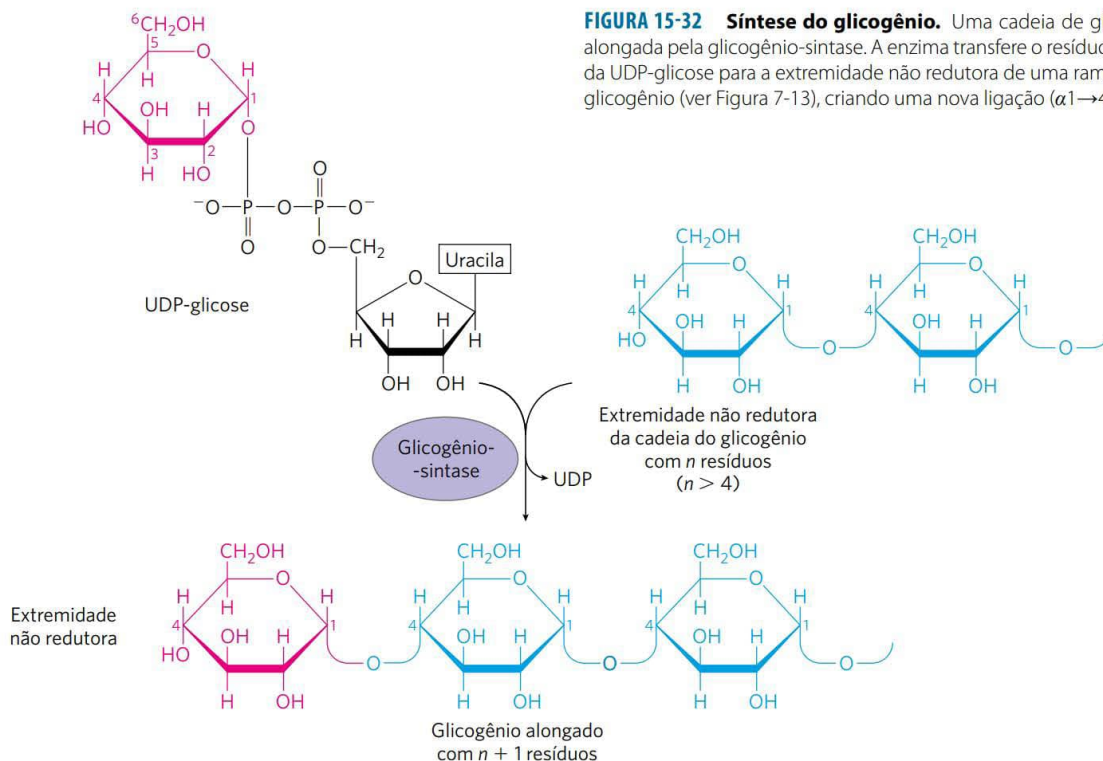
FIGURA 15-31 Formação de um nucleotídeo-açúcar. Ocorre uma reação de condensação entre um nucleosídeo-trifosfato (NTP) e um açúcar-fosfato. O oxigênio carregado negativamente no açúcar-fosfato serve como nucleófilo, atacando o fosfato α do nucleosídeo-trifosfato e deslocando pirofosfato. A hidrólise de PP_i pela pirofosfatase inorgânica impulsiona a reação para a frente.



A UDP-glicose é o doador imediato dos resíduos de glicose na reação catalisada pela **glicogênio-sintase**, que promove a transferência do resíduo de glicose da UDP-glicose para uma extremidade não redutora de uma molécula ramificada de glicogênio (**Figura 15-32**). O equilíbrio total da via desde a glicose-6-fosfato até o glicogênio acrescido de uma unidade de glicose favorece muito a síntese do polímero.

A glicogênio-sintase não pode formar as ligações ($\alpha 1 \rightarrow 6$) encontradas nos pontos de ramificação do glicogênio, as quais são formadas pela enzima de ramificação, também chamada de **amilo (1 \rightarrow 4)-(1 \rightarrow 6)-transglicosilase**, ou glicosil-(4 \rightarrow 6)-transferase. A enzima de ramificação do glicogênio catalisa a transferência de um fragmento terminal de 6 a 7 resíduos de glicose da extremidade não redutora de uma ramificação de glicogênio, contendo pelo menos 11 resíduos, para o grupo hidroxila em C-6 de um resíduo de glicose em uma posição mais interna da mesma ou de outra cadeia de glicogênio, criando, assim, uma nova ramificação (**Figura 15-33**). Resíduos adicionais de glicose podem ser ligados à nova ramificação pela glicogênio-sintase. O efeito biológico da adição de ramificações é tornar a molécula de

glicogênio mais solúvel e aumentar o número de extremidades não redutoras. Isso aumenta o número de sítios acessíveis à glicogênio-fosforilase e à glicogênio-sintase, pois ambas atuam apenas em extremidades não redutoras.



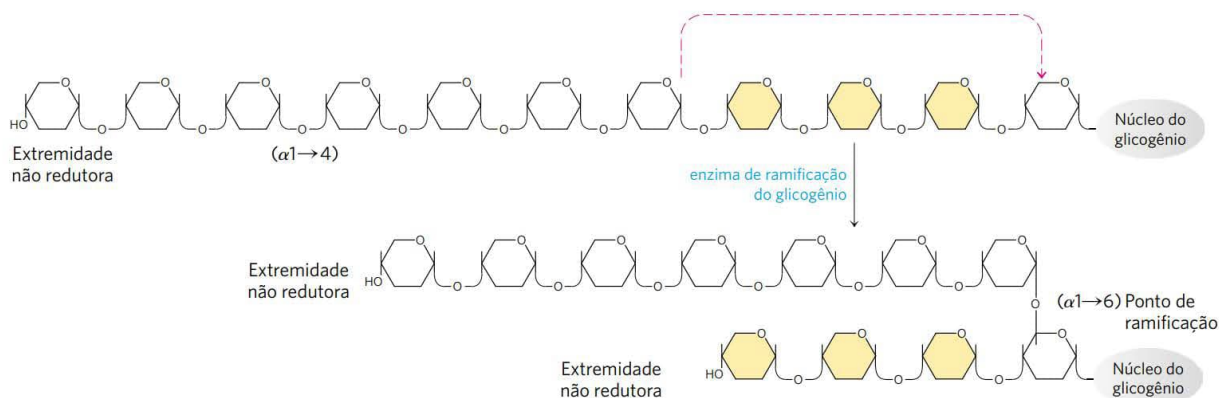


FIGURA 15-33 Síntese de uma ramificação do glicogênio. A enzima de ramificação do glicogênio [também chamada de amilo-(1→4)-(1→6)-transglicosilase, ou glicosil-(4→6)-transferase] forma um novo ponto de ramificação durante a síntese do glicogênio.

A glicogenina fornece um fragmento iniciador para a síntese do glicogênio

A glicogênio-sintase não consegue iniciar uma cadeia de glicogênio *de novo*. Ela necessita de um iniciador, geralmente uma cadeia pré-formada poliglicosídica com ligações ($\alpha 1 \rightarrow 4$) ou uma ramificação que tenha, pelo menos, oito resíduos de glicose. Então, como se inicia uma *nova* molécula de glicogênio? A intrigante proteína **glicogenina** (**Figura 15-34**) é ao mesmo tempo o iniciador, sobre o qual são montadas novas cadeias, e a enzima que catalisa a formação desse iniciador. A primeira etapa na síntese de uma nova molécula de glicogênio é a transferência de um resíduo de glicose da UDP-glicose para o grupo hidroxila da Tyr¹⁹⁴ da glicogenina, catalisada pela atividade glicosil-transferase intrínseca da proteína (**Figura 15-35**). A cadeia nascente alonga-se pela adição sequencial de mais sete resíduos de glicose, cada um derivado de uma UDP-glicose; as reações são catalisadas pela atividade de extensão de cadeia da glicogenina. Neste ponto, a glicogênio-sintase assume, alongando ainda mais a cadeia de glicogênio. A glicogenina permanece escondida dentro da partícula β de glicogênio, unida covalentemente à única extremidade redutora da molécula de glicogênio (**Figura 15-35b**). As consequências clí-

nicas de uma mutação no gene da glicogenina que suprime essa atividade de polimerização da proteína incluem fadiga muscular e fraqueza, depleção do glicogênio no fígado e batimento cardíaco irregular (arritmia cardíaca).

RESUMO 15.4 Metabolismo do glicogênio nos animais

- O glicogênio é armazenado no músculo e no fígado na forma de partículas grandes e insolúveis, que não contribuem de forma significativa para a osmolaridade do citosol. Nessas partículas, estão as enzimas que metabolizam o glicogênio, bem como as enzimas reguladoras.
- A glicogênio-fosforilase catalisa a clivagem por fosforólise nas extremidades não redutoras das cadeias do glicogênio, produzindo glicose-1-fosfato. A enzima de desramificação transfere as ramificações para as cadeias principais e libera o resíduo da ramificação ($\alpha 1 \rightarrow 6$) como glicose livre.
- A fosfoglicomutase interconverte glicose-1-fosfato e glicose-6-fosfato. A glicose-6-fosfato pode entrar na glicólise ou ser convertida, no fígado, em glicose livre pela glicose-6-fosfatase do retículo endoplasmático, sendo liberada para repor a glicose sanguínea.

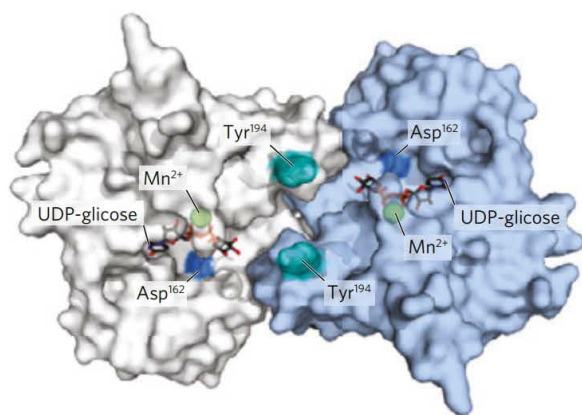
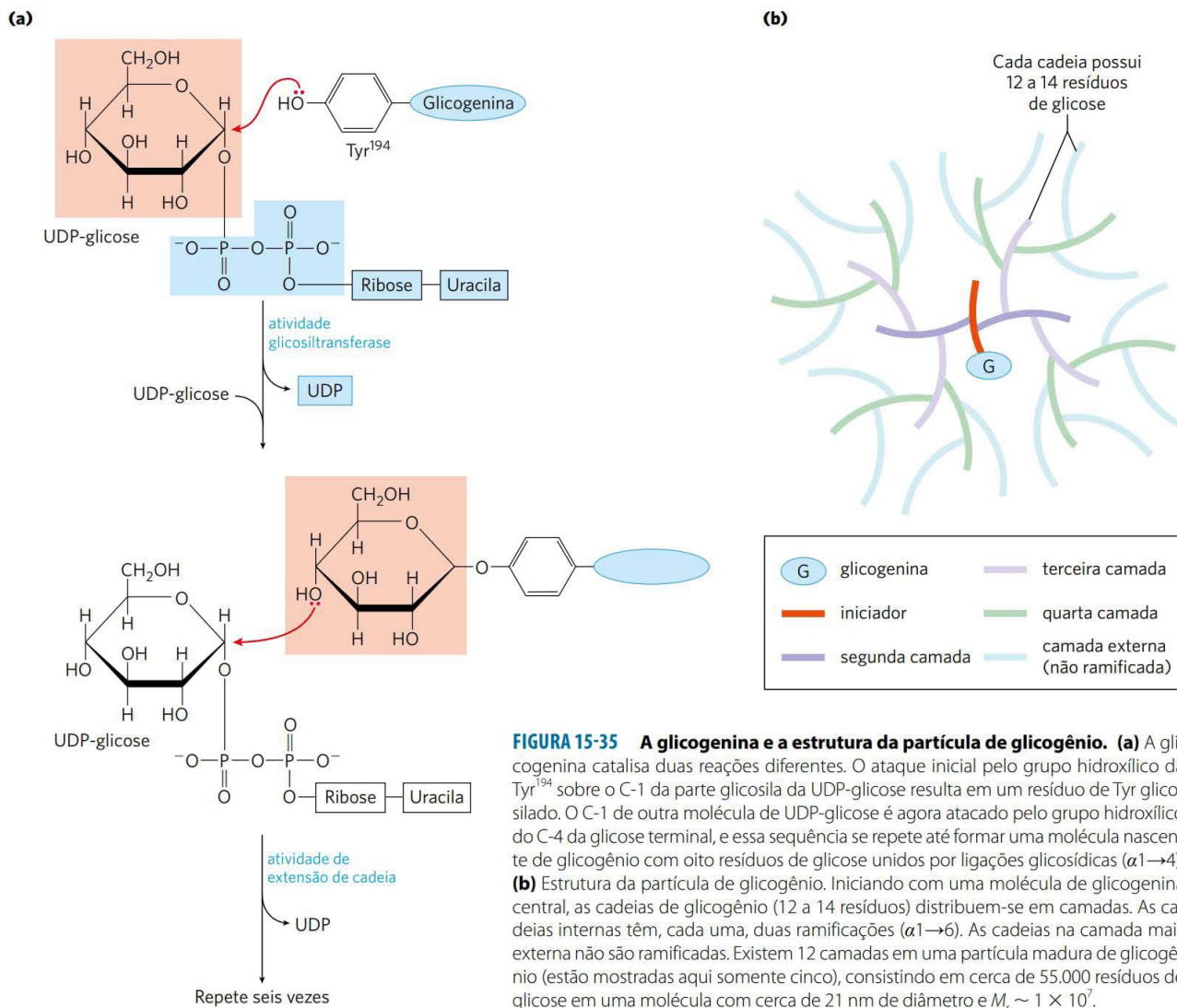


FIGURA 15-34 Estrutura da glicogenina. A glicogenina muscular (M_r 37.000) forma dímeros em solução. Os seres humanos têm uma segunda isoforma no fígado, a glicogenina 2. O substrato UDP-glicose está ligado a uma estrutura de Rossmann próximo da extremidade amina e a certa distância dos resíduos de Tyr¹⁹⁴ – 15 Å da Tyr no mesmo monômero, 12 Å da Tyr no parceiro dimérico. Cada UDP-glicose está ligada por meio de seus fosfatos a um íon de Mn^{2+} que é essencial para a catálise. Acredita-se que o Mn^{2+} atue comoceptor de pares de elétrons (ácido de Lewis) para estabilizar o grupo de fácil eliminação, UDP. A ligação glicosídica no produto tem a mesma configuração no C-1 da glicose que no substrato UDP-glicose, sugerindo que a transferência da glicose do UDP para a Tyr¹⁹⁴ ocorra em duas etapas. A primeira provavelmente é um ataque nucleofílico pelo Asp¹⁶², formando um intermediário temporário com a configuração invertida. Um segundo ataque nucleofílico pela Tyr¹⁹⁴ restabelece a configuração inicial. [Fonte: PDB ID 1LL2, B. J. Gibbons et al., *J. Mol. Biol.* 319:463, 2002.]



- O nucleotídeo-açúcar UDP-glicose doa resíduos de glicose para a extremidade não redutora do glicogênio na reação catalisada pela glicogênio-sintase. Uma outra enzima, a enzima de ramificação, produz as ligações ($\alpha 1 \rightarrow 6$) nos pontos de ramificação.
- Novas partículas de glicogênio se iniciam com a formação autocatalítica de uma ligação glicosídica entre a glicose da UDP-glicose e um resíduo de Tyr na proteína glicogenina, seguida pela adição de vários resíduos de glicose para formar um iniciador que pode sofrer os efeitos da glicogênio-sintase.

15.5 Regulação coordenada da síntese e da degradação do glicogênio

Conforme foi visto, a mobilização dos estoques de glicogênio é realizada pela glicogênio-fosforilase, que degrada glicogênio a glicose-1-fosfato (Figura 15-27). A glicogênio-fos-

forilase proporciona um caso especialmente esclarecedor de regulação enzimática. Esse foi um dos primeiros exemplos conhecidos de uma enzima regulada alostericamente e a primeira enzima que se revelou ser controlada por fosforilação reversível. Ela foi também uma das primeiras enzimas alostéricas cujas estruturas tridimensionais detalhadas para as formas ativa e inativa foram esclarecidas por estudos de cristalografia por raios X. A glicogênio-fosforilase é também outro exemplo de como as isoenzimas desempenham seu papel tecido-específico.

A glicogênio-fosforilase tem regulação alostérica e hormonal

No fim da década de 1930, Carl e Gerty Cori (Quadro 15-4) descobriram que a glicogênio-fosforilase do músculo esquelético existe em duas formas interconversíveis: **glicogênio-fosforilase a**, cataliticamente ativa, e **glicogênio-fosforilase b**, menos ativa (Figura 15-36). Estudos subsequentes



Earl W. Sutherland, Jr.,
1915-1974
[Fonte: Science Source.]

feitos por Earl Sutherland mostraram que a fosforilase *b* predomina no músculo em repouso, mas que, durante uma atividade muscular vigorosa, a adrenalina desencadeia a fosforilação de um resíduo específico de Ser na fosforilase *b*, convertendo-a em sua forma mais ativa, fosforilase *a*. (Observe que a glicogênio-fosforilase com frequência é referida simplesmente como fosforilase – o que ocorre por ter sido a primeira fosforilase a ser descoberta; o nome abreviado tem persistido no uso generalizado e na literatura.)

A enzima (fosforilase *b*-cinase) responsável pela ativação da fosforilase pela transferência de um grupo fosforila para seu resíduo de Ser é, ela própria, ativada por adrenalina ou glucagon por uma série de etapas mostradas na **Figura 15-37**. Sutherland descobriu o segundo mensageiro cAMP, cuja concentração aumenta em resposta ao estímulo pela adrenalina (no músculo) ou pelo glucagon (no fígado). Concentrações elevadas de cAMP iniciam uma **cascata enzimática**, na qual um catalisador ativa um segundo catalisador que ativa mais um catalisador (ver Seção 12.2). Essas cascatas permitem uma grande amplificação do sinal inicial (ver retângulos em cor-de-rosa na Figura 15-37). O aumento da [cAMP] ativa a proteína-quinase de

pendente de cAMP, também chamada de proteína-quinase A (PKA). Por sua vez, a PKA fosforila e ativa a **fosforilase *b*-cinase**, que catalisa a fosforilação dos resíduos de Ser nas duas subunidades idênticas da glicogênio-fosforilase, ativando-a e estimulando, assim, a degradação do glicogênio. No músculo, isso fornece combustível para a glicólise sustentar a contração muscular para a resposta de luta ou fuga sinalizada pela adrenalina. No fígado, a degradação do glicogênio age contra a baixa glicose sanguínea sinalizada pelo glucagon, liberando glicose no sangue. Essas diferentes funções se refletem em diferenças sutis nos mecanismos reguladores no músculo e no fígado. As glicogênio-fosforilases do fígado e do músculo são isoenzimas, codificadas por genes diferentes, e diferem em suas propriedades reguladoras.

No músculo, há dois mecanismos alostéricos de controle que se sobrepõem à regulação da fosforilase por modificação covalente (Figura 15-37). O Ca^{2+} , o sinal para a contração muscular, se liga à fosforilase *b*-cinase, ativando-a, promovendo a conversão da fosforilase *b* para sua forma ativa *a*. O Ca^{2+} se liga à subunidade δ da fosforilase *b*-cinase, uma calmodulina (ver Figura 12-12). O AMP, que se acumula no músculo em contração vigorosa como resultado da degradação do ATP, liga-se à fosforilase e a ativa, acelerando a liberação da glicose-1-fosfato a partir do glicogênio. Quando os níveis de ATP estão adequados, o ATP bloqueia o sítio alostérico ao qual o AMP se liga, causando a inativação da fosforilase.

Quando o músculo retorna ao repouso, uma segunda enzima, a **fosfoproteína-fosfatase 1 (PP1)**, remove os grupos fosforila da fosforilase *a*, convertendo-a em sua forma menos ativa, a fosforilase *b*.

À semelhança da enzima do músculo, a glicogênio-fosforilase do fígado é regulada hormonal (por fosforilação/desfosforilação) e alostericamente. A forma desfosforilada é totalmente inativa. Quando o nível de glicose sanguínea está muito baixo, o glucagon (agindo por meio do mecanismo de cascata, mostrado na Figura 15-37) ativa a fosforilase *b*-cinase, que, por sua vez, converte a fosforilase *b* em sua forma ativa *a*, iniciando a liberação da glicose para o sangue. Quando o nível sanguíneo de glicose retorna ao normal, a glicose entra nos hepatócitos e se liga a um sítio alostérico inibitório na fosforilase *a*. Essa ligação também produz uma mudança de conformação que expõe os resíduos fosforilados de Ser à PP1, que catalisa a desfosforilação desses resíduos, inativando a fosforilase (**Figura 15-38**). O sítio alostérico para a glicose permite à glicogênio-fosforilase hepática atuar como seu próprio sensor de glicose e responder adequadamente às alterações na glicose sanguínea.

A glicogênio-sintase também é regulada por fosforilação e desfosforilação

Assim como a glicogênio-fosforilase, a glicogênio-sintase pode existir nas formas fosforilada e desfosforilada (**Figura 15-39**). Sua forma ativa, **glicogênio-sintase *a***, é não fosforilada. A fosforilação das hidroxilas nas cadeias laterais de vários resíduos de Ser de ambas as subunidades converte a glicogênio-sintase *a* em **glicogênio-sintase *b***, que é inati-

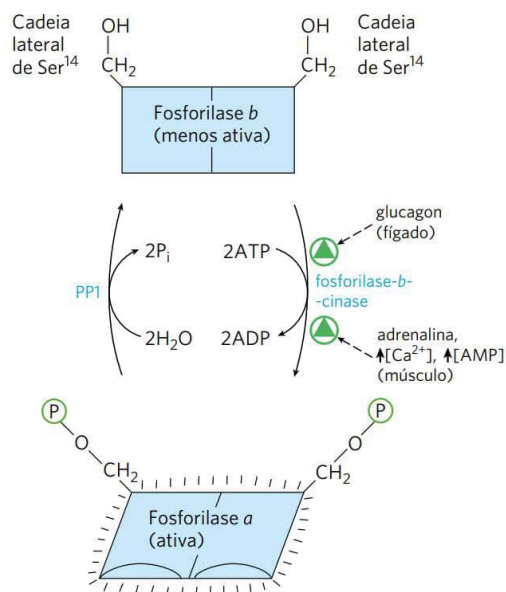
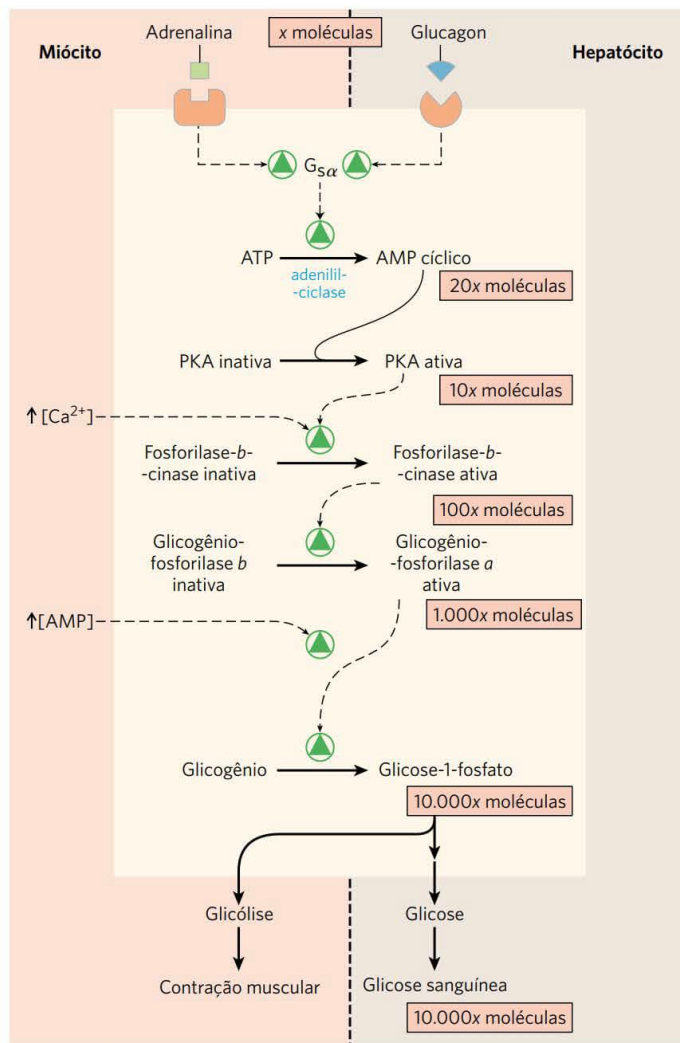


FIGURA 15-36 Regulação da glicogênio-fosforilase muscular por modificação covalente. Na forma mais ativa da enzima, a fosforilase *a*, os resíduos de Ser¹⁴, um de cada subunidade, estão fosforilados. A fosforilase *a* é convertida na fosforilase *b* (forma menos ativa) pela remoção enzimática desses grupos fosforila, efetuada pela fosfoproteína-fosfatase 1 (PP1). A fosforilase *b* pode ser reconvertida (reativada) em fosforilase *a* pela ação da fosforilase *b*-cinase. (Ver também Figura 6-43 para a regulação da glicogênio-fosforilase.)

FIGURA 15-37 Mecanismo de cascata para a ação da adrenalina e do glucagon. Tanto a adrenalina nos miócitos (à esquerda) como o glucagon nos hepatócitos (à direita) ligam-se a receptores específicos de superfície e ativam uma proteína de ligação a GTP, G_{sa} (ver Figura 12-7). A G_{sa} , quando ativada, causa um aumento na [cAMP], ativando a PKA. Isso inicia uma cascata de fosforilações; PKA ativa a fosforilase b -cinase, que ativa a glicogênio-fosforilase. Essas cascatas causam uma grande amplificação do sinal inicial; os números nos retângulos em cor salmão são provavelmente uma subestimativa do aumento real do número de moléculas em cada estágio da cascata. A subsequente degradação do glicogênio fornece glicose, que no miócito pode suprir o ATP (via glicólise) para a contração muscular, e no hepatócito é liberada para o sangue para se opor à glicose sanguínea baixa.



va na ausência da glicose-6-fosfato, seu ativador alostérico. A glicogênio-sintase é impressionante por sua capacidade de ser fosforilada em vários resíduos por, pelo menos, 11 diferentes proteínas-quinase. A cinase reguladora mais im-

portante é a **glicogênio-sintase-quinase 3 (GSK3)**, que adiciona grupos fosforila a três resíduos de Ser próximos à extremidade carboxílica da glicogênio-sintase, inativando-a fortemente. A ação da GSK3 é hierárquica; ela só pode

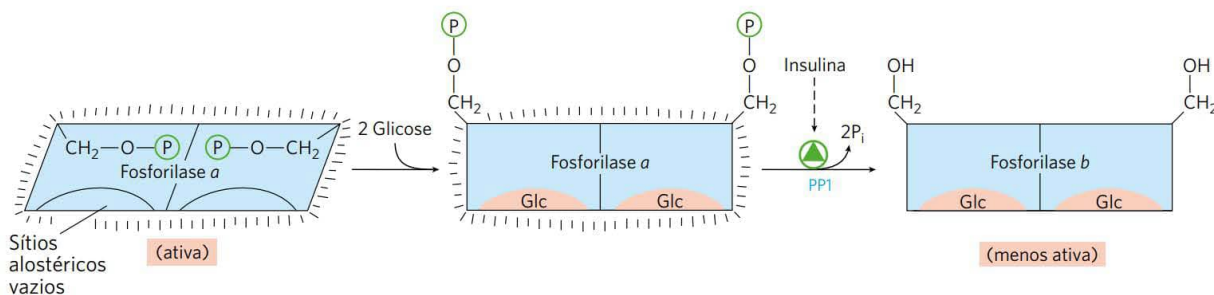
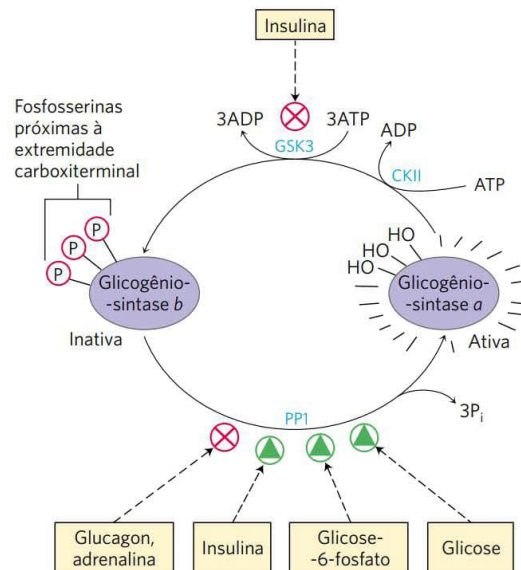


FIGURA 15-38 A glicogênio-fosforilase do fígado como sensor de glicose. A ligação da glicose a um sítio alostérico da isoenzima da fosforilase a do fígado induz uma mudança conformacional que expõe seus resíduos de Ser fosforilados à ação da fosfoproteína-fosfatase (PP1). Essa fosfatase converte a fosforilase a em fosforilase b , reduzindo agudamente a atividade de fosforilase e diminuindo a degradação do glicogênio em resposta à alta glicose sanguínea. A insulina também age indiretamente na estimulação da PP1 e na diminuição da degradação do glicogênio.

FIGURA 15-39 Efeitos da GSK3 sobre a atividade da glicogênio-sintase. A forma ativa, glicogênio-sintase α , tem três resíduos de Ser próximos à sua extremidade carboxila, os quais são fosforilados pela glicogênio-sintase-cinase 3 (GSK3). Isso a converte na sua forma inativa (β). A ação da GSK3 requer uma fosforilação prévia (preparação) pela caseína-cinase (CKII). A insulina desencadeia a ativação da glicogênio-sintase β por bloquear a atividade da GSK3 (consultar via na Figura 12-20) e ativar a fosfoproteína-fosfatase 1 (PP1). No músculo, a adrenalina ativa a PKA, que fosforila a proteína de associação ao glicogênio, GM (ver Figura 15-42), em um sítio que causa a dissociação da PP1 do glicogênio. A glicose-6-fosfato favorece a desfosforilação da glicogênio-sintase por se ligar a ela e promover uma conformação que é um bom substrato para a PP1. A glicose também promove a desfosforilação; a ligação da glicose à glicogênio-fosforilase α força uma mudança conformacional que favorece a desfosforilação da glicogênio-fosforilase β , permitindo, assim, a ação da PP1 (ver Figura 15-41).



fosforilar a glicogênio-sintase depois que outra proteína-cinase, a **caseína-cinase II (CKII)**, tenha fosforilado a glicogênio-sintase em um resíduo próximo, evento chamado de **preparação (Figura 15-40a)**. A proteína-cinase ativada por AMP (AMPK), que se associa aos grânulos de glicogênio por meio de seu domínio de ligação a carboidratos, também fosforila a glicogênio-sintase, inibindo a síntese de glicogênio durante períodos de estresse metabólico.

No fígado, a conversão da glicogênio-sintase β em sua forma ativa é promovida pela PP1, que se encontra ligada à partícula de glicogênio por meio de G_L , uma subunidade da PP1. A PP1 remove os grupos fosforila dos três resíduos de Ser fosforilados pela GSK3. A glicose-6-fosfato liga-se a um sítio alostérico na glicogênio-sintase β , tornando a enzima um substrato melhor para a desfosforilação pela PP1 e causando sua inativação. Por analogia com a glicogênio-fosfo-

rilase, que age como sensor de glicose, a glicogênio-sintase pode ser considerada um sensor de glicose-6-fosfato. No músculo, uma fosfatase diferente pode ter o mesmo papel desempenhado pela PP1 no fígado, ativando a glicogênio-sintase por desfosforilação.

A glicogênio-sintase-cinase 3 controla algumas ações da insulina

Conforme visto no Capítulo 12, a insulina desencadeia mudanças intracelulares pela ativação de uma proteína-cinase

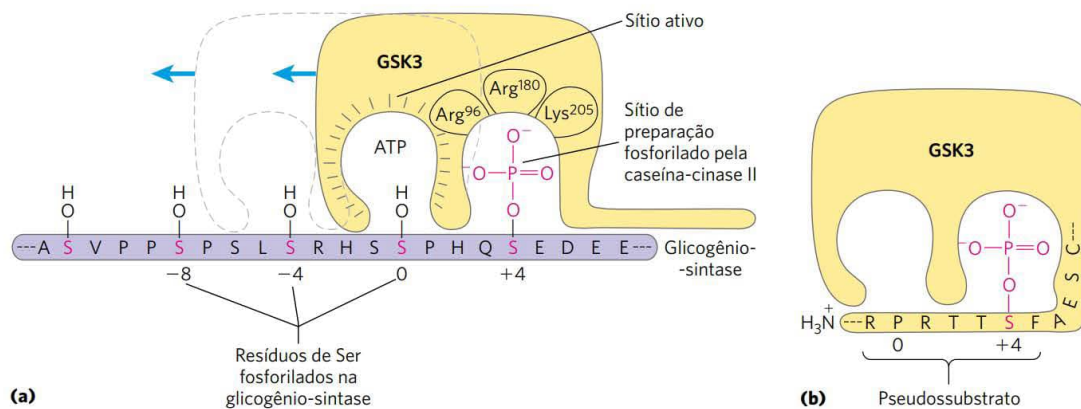


FIGURA 15-40 Preparação para a fosforilação da glicogênio-sintase pela GSK3. (a) A glicogênio-sintase-cinase 3 associa-se primeiramente com seu substrato (glicogênio-sintase) por interação entre os três resíduos carregados positivamente (Arg^{96} , Arg^{180} , Lys^{205}) e um resíduo de fosfoserina na posição +4 no substrato. (Para orientação, o resíduo de Ser ou Thr a ser fosforilado no substrato está marcado com índice 0. Os resíduos no lado aminoterminal desse resíduo estão numerados como -1, -2, e assim por diante; os resíduos no lado carboxiterminal estão numerados como +1, +2, e assim por diante.) Essa associação alinha o sítio ativo da enzima com o resíduo de Ser na posição 0, que ela fosforila. Isso cria um novo sítio de preparação, e a enzima se desloca ao longo da proteína para fosforilar o resíduo de Ser na posição -4, e, a seguir, a Ser na posição -8. (b) A GSK3 tem um resíduo de Ser próximo à sua extremidade aminoterminal que pode ser fosforilado pela PKA ou pela PKB (ver Figura 15-41). Isso produz uma região de "pseudossíntese" na GSK3, que se dobra para o sítio de preparação e torna o sítio ativo inacessível a outro substrato proteico, inibindo a GSK3 até que a PP1 remova o grupo fosforila da região do pseudossíntese. Outras proteínas que são substrato para a GSK3 também têm um sítio de preparação na posição +4, que deve ser fosforilado por outra proteína-cinase antes que a GSK3 possa agir sobre elas. (Ver também Figuras 6-38 e 12-25b sobre a regulação da glicogênio-sintase.)

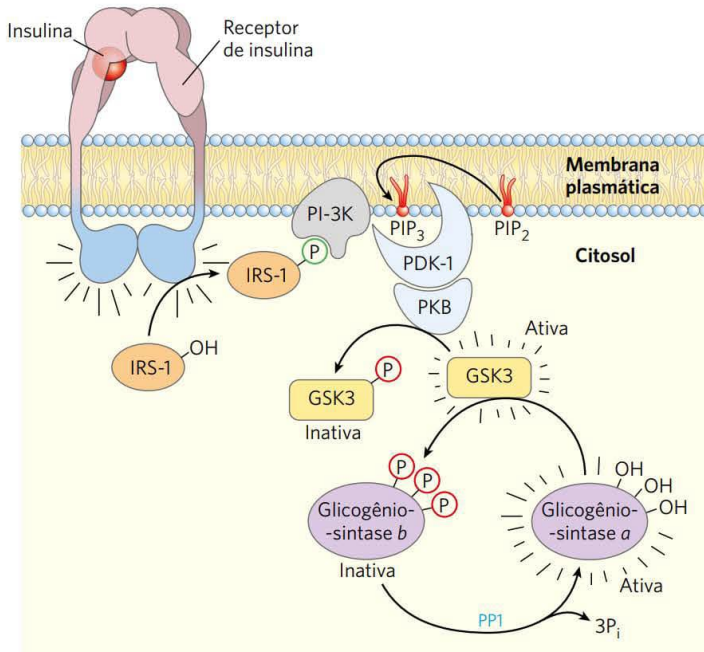


FIGURA 15-41 O caminho a partir da insulina até a GSK3 e a glicogênio-sintase. A ligação da insulina ao seu receptor ativa nele uma tirosina-proteína-cinase, que fosforila o substrato 1 do receptor da insulina (IRS-1). A fosfotirosina nessa proteína é, então, ligada pela fosfatidilinositol-3-cinase (PI-3K), que converte, na membrana, o fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) em fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato (PIP₃). Uma proteína-cinase (PDK-1), que é ativada quando ligada ao PIP₃, ativa uma segunda proteína-cinase (PKB), que fosforila a glicogênio-sintase-cinase 3 (GSK3) na sua região de pseudossustrato, inativando-a pelos mecanismos mostrados na Figura 15-40b. A inativação da GSK3 permite que a fosfoproteína-fosfatase 1 (PP1) desfosforile e ative a glicogênio-sintase. Dessa forma, a insulina estimula a síntese do glicogênio. (Ver Figura 12-20 para mais detalhes sobre a ação da insulina.)

(PKB) que, por sua vez, fosforila e inativa a GSK3 (**Figura 15-41**; ver também Figura 12-20). A fosforilação de um resíduo de Ser próximo da extremidade amina da GSK3 converte esta região da proteína em um pseudossustrato, que se dobra para dentro do sítio ao qual normalmente se liga o resíduo de Ser previamente fosforilado na preparação do substrato (Figura 15-40b). Isso impede a GSK3 de se ligar ao sítio de preparação do substrato verdadeiro, inativando, assim, a enzima, o que faz pender o equilíbrio em favor da desfosforilação da glicogênio-sintase pela PP1. A glicogênio-fosforilase também pode afetar a fosforilação da glicogênio-sintase: a glicogênio-fosforilase ativada inibe PP1 diretamente, impedindo-a de ativar a glicogênio-sintase (Figura 15-39).

Embora tenha sido descoberta pelo seu papel no metabolismo do glicogênio (daí o nome glicogênio-sintase-cinase), a GSK3 tem um papel muito mais abrangente que o de regulação da glicogênio-sintase. Ela é responsável por mediar a sinalização pela insulina e outros fatores de crescimento e nutrientes, atuando na especificação dos destinos celulares durante o desenvolvimento embrionário. Entre os seus alvos estão proteínas do citoesqueleto e proteínas essenciais para a síntese de mRNA e de proteínas. Esses alvos, assim como a glicogênio-sintase, precisam sofrer uma fosforilação preparatória por outra proteína-cinase para que possam ser fosforilados pela GSK3.

A fosfoproteína-fosfatase 1 é central no metabolismo do glicogênio

Uma única enzima, PP1, pode remover grupos fosforila das três enzimas que são fosforiladas em resposta ao glucagon (no fígado) e à adrenalina (no fígado e no músculo): fosforilase-cinase, glicogênio-fosforilase e glicogênio-sintase.

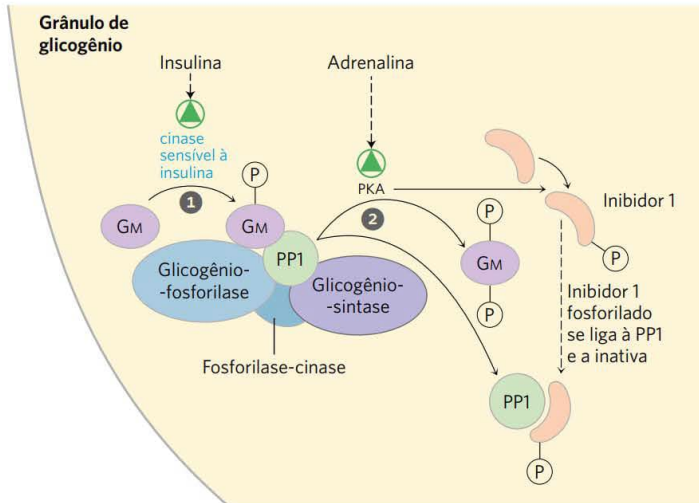
A insulina estimula a síntese do glicogênio por ativar a PP1 e inativar a GSK3.

A subunidade catalítica da fosfoproteína-fosfatase 1 (PP1c) não existe livre no citosol. Ela está firmemente ligada às suas proteínas-alvo por uma proteína da família das **proteínas de associação ao glicogênio** que se liga ao glicogênio e a cada uma das três enzimas: glicogênio-fosforilase, fosforilase-cinase e glicogênio-sintase (**Figura 15-42**). A própria PP1 está sujeita à regulação covalente e alostérica: ela é inativada quando fosforilada pela PKA e é ativada alostericamente pela glicose-6-fosfato.

Sinais alostéricos e hormonais coordenam integralmente o metabolismo dos carboidratos

Após abordar os mecanismos que regulam as enzimas individuais, agora é possível considerar as variações totais no metabolismo dos carboidratos que ocorrem no estado bem alimentado, durante o jejum e na resposta de luta ou fuga – sinalizados, respectivamente, por insulina, glucagon e adrenalina. É preciso destacar dois casos nos quais a regulação tem finalidades diferentes: (1) o papel dos hepatócitos no suprimento de glicose para o sangue, e (2) o uso “egoísta” dos carboidratos como combustível pelos tecidos extra-hepáticos, exemplificados de modo típico pelo músculo esquelético (miócitos), para manter suas próprias atividades.

Após a ingestão de uma refeição rica em carboidratos, a elevação da glicose sanguínea provoca a liberação de insulina (**Figura 15-43**, parte superior). Nos hepatócitos, a insulina tem dois efeitos imediatos: ela inativa a GSK3, agindo por meio da cascata mostrada na Figura 15-41, e ativa uma proteína-fosfatase, talvez a PP1. Essas duas ações ativam totalmente a glicogênio-sintase. A PP1 também inativa a

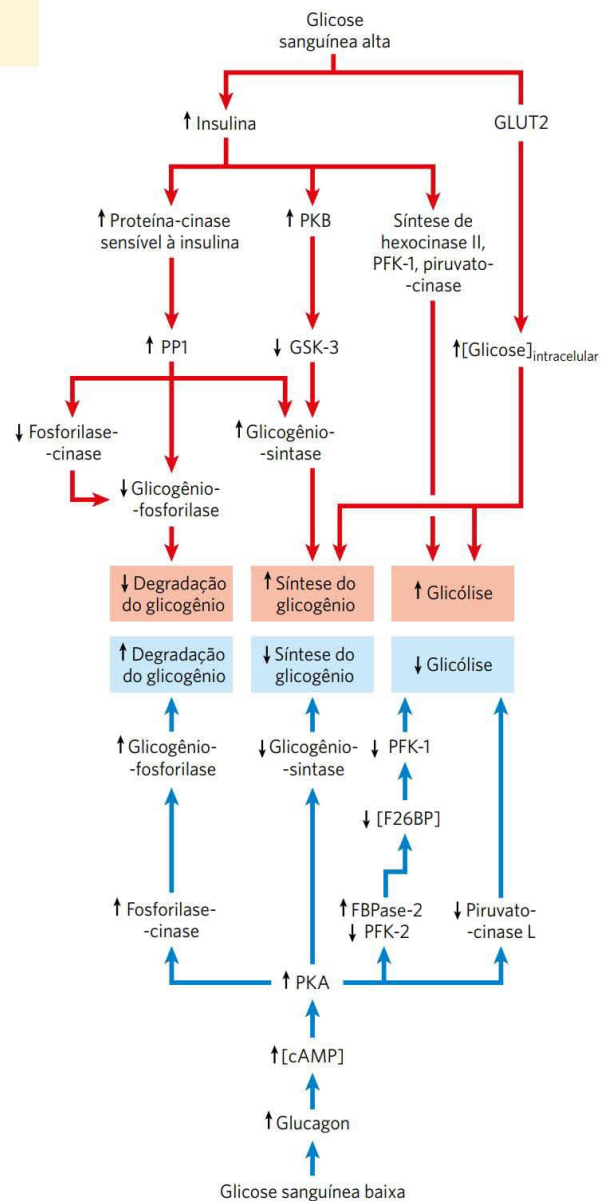
**FIGURA 15-42** Proteína de associação ao glicogênio GM.

A proteína GM de associação ao glicogênio pertence à família de proteínas que ligam outras proteínas (incluindo PP1) às partículas de glicogênio. A GM pode ser fosforilada em dois sítios diferentes em resposta à insulina ou à adrenalina. 1 A fosforilação da GM no sítio 1, estimulada pela insulina, ativa a PP1, que desfosforila a fosforilase-cinase, a glicogênio-fosforilase e a glicogênio-sintase. 2 A fosforilação da GM no sítio 2, estimulada pela adrenalina, causa a dissociação de PP1 da partícula de glicogênio, impedindo seu acesso à glicogênio-fosforilase e à glicogênio-sintase. A PKA também fosforila uma proteína (inibidor 1) que, quando fosforilada, inibe a PP1. Dessa forma, a insulina inibe a degradação do glicogênio e estimula a sua síntese, e a adrenalina (ou o glucagon, no fígado) tem o efeito oposto.

glicogênio-fosforilase α e a fosforilase-cinase pela desfosforilação de ambas, interrompendo de forma efetiva a degradação do glicogênio. A glicose entra no hepatócito por meio do transportador de alta capacidade GLUT2, sempre presente na membrana plasmática, e a glicose intracelular elevada leva à dissociação da hexocinase IV (glicocinase) de sua proteína reguladora nuclear (Figura 15-15). A hexocinase IV entra no citosol e fosforila a glicose, estimulando a glicólise, além de fornecer o precursor para a síntese de glicogênio. Sob essas condições, os hepatócitos usam o excesso de glicose do sangue para sintetizar glicogênio até o limite de 10% do peso total do fígado.

Entre as refeições, ou durante um jejum prolongado, a queda da glicose sanguínea provoca a liberação de glucagon, o qual, agindo por meio da cascata mostrada na Figura 15-37, ativa a PKA. Essa enzima controla todos os efeitos do glucagon (Figura 15-43, parte inferior). Ela fosforila a fosforilase-cinase, ativando-a e levando à ativação da glicogênio-fosforilase; fosforila a glicogênio-sintase, inativando-a e bloqueando a síntese de glicogênio; fosforila a PFK-2/ FBPase-2, levando a uma redução na concentração do regulador frutose-2,6-bisfosfato, o que resulta na inativação da enzima glicolítica PFK-1 e na ativação da enzima gliconeogênica FBPase-1; e ela fosforila e inativa a enzima glicolítica piruvato-cinase. Sob essas condições, o fígado produz glicose-6-fosfato pela degradação do glicogênio e pela gliconeogênese e para de usar a glicose na glicólise ou na síntese de glicogênio, maximizando a quantidade de glicose que pode liberar para o sangue. Essa liberação de glicose é possível somente no fígado e no rim, uma vez que outros tecidos não têm glicose-6-fosfatase (Figura 15-30).

FIGURA 15-43 Regulação do metabolismo de carboidratos no fígado. As setas coloridas indicam relações causais entre as mudanças que conectam. Por exemplo, uma seta de $\downarrow A$ para $\uparrow B$ significa que uma redução de A causa um aumento de B. As setas vermelhas conectam eventos resultantes da glicose sanguínea alta; as setas azuis conectam eventos resultantes da glicose sanguínea baixa.



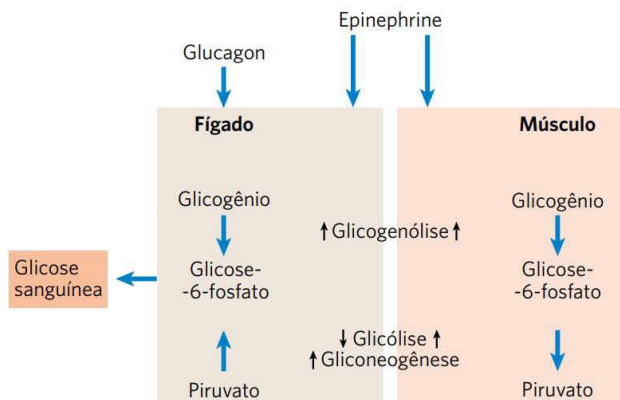


FIGURA 15-44 Diferenças na regulação do metabolismo de carboidratos no fígado e no músculo. No fígado, glucagon (indicando baixa glicose sanguínea) ou adrenalina (sinalizando a necessidade de lutar ou correr) têm o efeito de maximizar a saída da glicose para a corrente sanguínea. No músculo, a adrenalina aumenta a degradação do glicogênio e a glicólise, que, juntas, fornecem combustível para a produção do ATP necessário na contração muscular.

A fisiologia do músculo esquelético difere da do fígado em três aspectos importantes para a nossa discussão sobre regulação metabólica (**Figura 15-44**): (1) o músculo usa seu glicogênio armazenado somente para suas próprias necessidades; (2) quando passa do repouso para a contração vigorosa, o músculo sofre mudanças muito grandes em sua demanda por ATP, a qual é suprida pela glicólise; (3) o músculo não tem a maquinaria enzimática para a gliconeogênese. A regulação do metabolismo de carboidratos no músculo reflete essas diferenças em relação ao fígado. Em primeiro lugar, os miócitos não têm receptores para o glucagon. Em segundo lugar, a isoenzima muscular da piruvato-cinase não é fosforilada pela PKA, e, assim, a glicólise não é interrompida quando a [cAMP] estiver alta. Na verdade, o cAMP *aumenta* a velocidade da glicólise no músculo, provavelmente por ativar a glicogênio-fosforilase. Quando a adrenalina é liberada no sangue em situações de luta ou fuga, a PKA é ativada pela elevação da [cAMP] e fosforila e ativa a glicogênio-fosforilase-cinase. As consequentes fosforilação e ativação da glicogênio-fosforilase resultam em degradação mais rápida do glicogênio. A adrenalina não é liberada em condições de baixo estresse, porém, com cada estímulo neuronal da contração muscular, a $[Ca^{2+}]$ no citosol aumenta brevemente e ativa a fosforilase-cinase por meio de sua subunidade calmodulina.

A elevação da insulina provoca aumento na síntese do glicogênio nos miócitos pela ativação da PP1 e inativação da GSK3. Ao contrário dos hepatócitos, os miócitos têm uma reserva de transportadores GLUT4 sequestrada em vesículas intracelulares. A insulina provoca seu deslocamento para a membrana plasmática (ver Figura 12-20), onde eles permitem o aumento na captação de glicose. Como consequência, os miócitos ajudam a baixar a glicose sanguínea em resposta à insulina, uma vez que

aumentam a taxa de captação de glicose, a síntese de glicogênio e a glicólise.

Os metabolismos de carboidratos e de lipídeos são integrados por mecanismos hormonais e alostéricos

Apesar de complexa, a regulação do metabolismo de carboidratos está longe de representar a história completa do metabolismo energético. O metabolismo das gorduras e dos ácidos graxos está intimamente ligado ao dos carboidratos. Sinais hormonais como insulina e alterações na dieta ou exercício são igualmente importantes na regulação do metabolismo das gorduras e na integração com o dos carboidratos. O Capítulo 23 volta a abordar essa integração metabólica global em mamíferos, após serem estudadas as vias metabólicas das gorduras e dos aminoácidos (Capítulos 17 e 18). A mensagem que se deseja transmitir aqui é que as vias metabólicas estão sujeitas a controles reguladores complexos extremamente sensíveis a alterações nas condições metabólicas. Esses mecanismos agem no ajuste do fluxo de metabólitos por várias vias metabólicas, conforme a necessidade da célula e do organismo, e o fazem sem causar alterações importantes nas concentrações dos intermediários compartilhados por outras vias.

RESUMO 15.5 Regulação coordenada da síntese e da degradação do glicogênio

- A glicogênio-fosforilase é ativada em resposta ao glucagon ou à adrenalina, que aumentam a [cAMP] e ativam a PKA. A PKA fosforila e ativa a fosforilase-cinase, que converte a glicogênio-fosforilase *b* em sua forma ativa *a*.
- A fosfoproteína-fosfatase 1 (PP1) reverte a fosforilação da glicogênio-fosforilase *a*, inativando-a. A glicose ligase à isoenzima hepática da glicogênio-fosforilase *a*, o que favorece sua desfosforilação e inativação.
- A glicogênio-sintase *a* é inativada por fosforilação catalisada pela GSK3. A insulina bloqueia a GSK3. A PP1, que é ativada pela insulina, reverte a inibição, pois causa a desfosforilação da glicogênio-sintase *b*.
- A insulina aumenta a captação da glicose pelos miócitos e adipócitos por provocar o deslocamento do transportador GLUT4 para a membrana plasmática.
- A insulina estimula a síntese das hexocinases II e IV, PFK-1, piruvato-cinase e várias enzimas envolvidas na síntese de lipídeos. A insulina estimula a síntese de glicogênio no músculo e no fígado.
- No fígado, o glucagon estimula a degradação do glicogênio e a gliconeogênese, enquanto bloqueia a glicólise, poupando, dessa forma, glicose para exportá-la para o cérebro e outros tecidos.
- No músculo, a adrenalina estimula a degradação do glicogênio e a glicólise, fornecendo ATP para sustentar a contração.

Termos-chave

Termos em negrito estão definidos no glossário.

glicose-6-fosfato 575	proteína de ligação ao elemento de resposta aos carboidratos (ChREBP) 597
homeostasia 577	proteína de ligação ao elemento regulador dos esteróis (SREBP) 598
diferenciação celular 577	proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico (CREB) 598
fator de transcrição 577	FOXO1 598
elemento de resposta 577	glicogénólise 601
reciclagem 577	glicogênese 601
transcriptoma 578	glicose-1-fosfato 601
proteoma 578	enzima de desramificação 601
metaboloma 578	oligo ($\alpha 1 \rightarrow 6$)-($\alpha 1 \rightarrow 4$)-glicano-transferase 601
regulação metabólica 580	fosfoglicomutase 601
controle metabólico 580	nucleotídeos-açúcar 603
razão da ação das massas, Q 580	UDP-glicose-pirofosforilase 605
adenilil-cinase 582	amilo (1 \rightarrow 4)-(1 \rightarrow 6)-transglicosilase 606
proteína-cinase ativada por AMP (AMPK) 582	glicogenina 607
coeficiente de controle de fluxo, C 585	glicogênio-fosforilase <i>a</i> 609
fluxo, J 585	glicogênio-fosforilase <i>b</i> 609
coeficiente de elasticidade, ϵ 585	cascata enzimática 609
coeficiente de resposta, R 587	fosforilase <i>b</i> -cinase 609
gliconeogênese 589	fosfoproteína-fosfatase 1 (PP1) 609
ciclo fútil 590	glicogênio-sintase <i>a</i> 609
ciclo de substrato 590	glicogênio-sintase <i>b</i> 609
hexocinase II 590	glicogênio-sintase-cinase 3 (GSK3) 610
hexocinase I 591	caseína-cinase II (CKII) 611
hexocinase IV (glicocinase) 591	preparação 611
GLUT2 591	proteínas de associação ao glicogênio 612
glucagon 593	
frutose-2,6-bisfosfato 593	
fosfofrutocinase 2 (PFK-2) 593	
frutose-2,6-bisfosfatase (FBPase-2) 593	

Teste seu conhecimento

1. Medida das concentrações intracelulares de metabólitos A medida das concentrações intracelulares dos metabólitos em uma célula viva apresenta grandes dificuldades experimentais – geralmente a célula deve ser destruída para que possam ser medidas as concentrações dos metabólitos. Além disso, as enzimas catalisam interconversões metabólicas muito rapidamente, de forma que um problema comum associado com essas medidas é que os dados não refletem as concentrações fisiológicas dos metabólitos, mas sim as concentrações no equilíbrio. Uma técnica experimental confiável requer que todas as

reações catalisadas pelas enzimas sejam interrompidas instantaneamente no tecido intacto para que os intermediários metabólicos não sofram alteração. Esse objetivo é alcançado pela compressão rápida do tecido entre grandes placas de alumínio resfriadas com nitrogênio líquido (-190°C), processo chamado de **compressão e congelamento**. Após o congelamento, que interrompe instantaneamente a ação enzimática, o tecido é pulverizado, e as enzimas são inativadas por precipitação com ácido perclórico. O precipitado é removido por centrifugação, e os metabólitos são analisados no extrato sobrenadante limpo. Para calcular as concentrações intracelulares, o volume intracelular é determinado a partir do conteúdo total de água do tecido e de uma medida do volume extracelular.

As concentrações intracelulares dos substratos e dos produtos da reação da fosfofrutocinase 1 em tecido cardíaco isolado de rato estão na tabela a seguir.

Metabólito	Concentration (μM) ^a
Frutose-6-fosfato	87,0
Frutose-1,6-bisfosfato	22,0
ATP	11.400
ADP	1.320

Fonte: dados obtidos de J. R. Williamson, *J. Biol. Chem.* 240:2308, 1965.

^aCalculado como $\mu\text{mol/mL}$ de água intracelular.

- Calcule Q , [frutose-1,6-bisfosfato]/[ADP]/[frutose-6-fosfato][ATP], para a reação da PFK-1 sob condições fisiológicas.
- Dado um $\Delta G'^{\circ}$ para a reação da PFK-1 de $-14,2 \text{ kJ/mol}$, calcule a constante de equilíbrio para esta reação.
- Compare os valores de Q e K'_{eq} . A reação fisiológica está longe ou próxima do equilíbrio? Explique. O que este experimento sugere sobre o papel da PFK-1 como enzima reguladora?

2. Todas as reações metabólicas estão em equilíbrio?

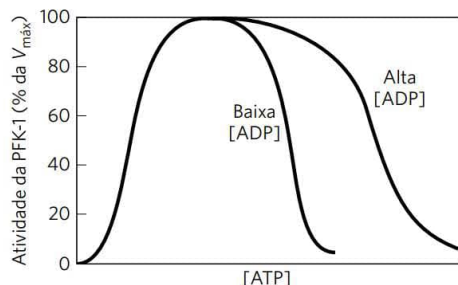
- O fosfoenolpiruvato (PEP) é um dos dois doadores de grupos fosforila na síntese de ATP durante a glicólise. Em eritrócitos humanos, a concentração de ATP no estado estacionário é $2,24 \text{ mM}$, a de ADP é $0,25 \text{ mM}$ e a de piruvato é $0,051 \text{ mM}$. Calcule a concentração de PEP a 25°C , considerando que a reação da piruvato-cinase (ver Figura 13-13) esteja no equilíbrio na célula.
- A concentração fisiológica de PEP nos eritrócitos humanos é $0,023 \text{ mM}$. Compare-a com o valor obtido em (a). Explique o significado dessa diferença.

3. Efeito do suprimento de O_2 sobre a velocidade da glicólise

As etapas reguladas da glicólise na célula intacta podem ser identificadas pelo estudo do catabolismo da glicose nos tecidos ou nos órgãos inteiros. Por exemplo, o consumo de glicose pelo músculo cardíaco pode ser medido pela circulação artificial de sangue através de um coração intacto isolado e pela medida da concentração da glicose antes e depois de o sangue passar pelo coração. Se o sangue circulante é desoxigenado, o músculo cardíaco consome glicose em uma velocidade constante. Quando se adiciona oxigênio ao sangue, a velocidade do consumo de glicose diminui drasticamente, sendo, então, mantida na velocidade mais baixa. Explique.

4. Regulação da PFK-1 O efeito do ATP sobre a enzima alostérica PFK-1 está mostrado a seguir. Para certa concentração de frutose-6-fosfato, a atividade da PFK-1 aumenta com o

aumento da concentração de ATP, até um ponto além do qual o aumento da concentração do ATP inibe a enzima.



- Explique como o ATP pode ser tanto substrato como inibidor para a PFK-1. Como a enzima é regulada por ATP?
- De que forma a glicólise é regulada pelos níveis de ATP?
- A inibição da PFK-1 pelo ATP diminui quando a concentração de ADP é alta, conforme mostrado na ilustração. Como essa observação pode ser explicada?

5. Concentração celular de glicose A concentração da glicose no plasma sanguíneo humano é mantida em cerca de 5 mM. A concentração da glicose livre dentro de um miócito é muito mais baixa. Por que a concentração na célula é tão baixa? O que acontece com a glicose após entrar na célula? A glicose é administrada de modo intravenoso como fonte de alimento em determinadas situações clínicas. Dado que a transformação da glicose em glicose-6-fosfato consome ATP, por que não administrar glicose-6-fosfato?

6. Atividade enzimática e função fisiológica A V_{\max} da glicogênio-fosforilase do músculo esquelético é muito maior do que a V_{\max} da mesma enzima do tecido hepático.

- Qual é a função fisiológica da glicogênio-fosforilase no músculo esquelético? E no tecido hepático?
- Por que a V_{\max} da enzima do músculo precisa ser maior do que a da enzima do fígado?

7. Equilíbrio da glicogênio-fosforilase A glicogênio-fosforilase catalisa a remoção de glicose do glicogênio. O ΔG° para esta reação é 3,1 kJ/mol.

- Calcule a razão entre a $[P_i]$ e a [glicose-1-fosfato] quando a reação está em equilíbrio. (Dica: a remoção de unidades de glicose do glicogênio não altera a concentração do glicogênio.)
- A razão $[P_i]/[glicose-1-fosfato]$ medida nos miócitos em condições fisiológicas é maior que 100:1. O que isso indica a respeito da direção do fluxo metabólico pela reação da glicogênio-fosforilase no músculo?
- Por que as razões no equilíbrio e em condições fisiológicas são diferentes? Qual é o possível significado para essa diferença?

8. Regulação da glicogênio-fosforilase No tecido muscular, a taxa de conversão do glicogênio em glicose-6-fosfato é determinada pela razão entre a fosforilase *a* (ativa) e a fosforilase *b* (menos ativa). Determine o que acontece à taxa de degradação do glicogênio se uma preparação de músculo contendo glicogênio-fosforilase for tratada com (a) fosforilase-cinase e ATP; (b) PP1; (c) adrenalina.

9. Degradação do glicogênio em músculo de coelho O uso intracelular da glicose e do glicogênio é rigidamente

regulado em quatro pontos. Para comparar a regulação da glicólise quando existe oxigênio abundante ou oxigênio escasso, considere a utilização da glicose e do glicogênio pelo músculo da perna de coelho em duas condições fisiológicas: coelho em repouso, com baixa demanda por ATP, e coelho que vê seu inimigo mortal, o coiote, e dispara para sua toca. Para cada condição, determine os níveis relativos (alto, intermediário, baixo) de AMP, ATP, citrato e acetil-CoA e descreva como esses níveis afetam o fluxo de metabólitos pela glicólise com a regulação de enzimas específicas. Em períodos de estresse, o músculo da perna do coelho produz a maior parte do ATP por glicólise anaeróbica (fermentação a lactato) e muito pouco por oxidação da acetil-CoA derivada da degradação das gorduras.

10. A degradação do glicogênio em pássaros migratórios Ao contrário do coelho e sua corrida curta, os pássaros migratórios requerem energia por longos períodos de tempo. Os patos, por exemplo, geralmente voam vários milhares de quilômetros durante sua migração anual. Os músculos de voo dos pássaros migratórios têm alta capacidade oxidativa e obtêm o ATP necessário por meio da oxidação da acetil-CoA (obtida das gorduras) via ciclo do ácido cítrico. Compare a regulação da glicólise no músculo durante intensa atividade de curta duração, como no caso do coelho em fuga, e durante uma atividade prolongada, como no caso do pato migratório. Por que a regulação deve ser diferente nos dois casos?



11. Defeitos enzimáticos no metabolismo dos carboidratos Segue-se o resumo do estudo de quatro casos clínicos. Determine, para cada caso, qual enzima está com defeito e indique, a partir da lista fornecida no final do problema, o tratamento apropriado. Justifique suas escolhas. Responda às perguntas em cada estudo de caso. (Talvez você precise recorrer a informações do Capítulo 14.)

Caso A O paciente apresenta vômito e diarreia logo após a ingestão de leite. O teste de tolerância à lactose é realizado. (O paciente ingere uma quantidade-padrão de lactose, e as concentrações plasmáticas de glicose e de galactose são medidas a intervalos. Nas pessoas com metabolismo de carboidratos normal, os níveis aumentam até o máximo em cerca de 1 hora, e então diminuem.) As concentrações sanguíneas de glicose e de galactose do paciente não aumentaram durante o teste. Por que a glicose e a galactose aumentam no sangue e depois diminuem durante o teste em pessoas saudáveis? Por que não aumentam no paciente?

Caso B O paciente apresenta vômito e diarreia após a ingestão de leite. No seu sangue, foi encontrada uma baixa concentração de glicose, mas uma concentração muito mais alta do que o normal de açúcares redutores. O exame de urina deu positivo para galactose. Por que a concentração de açúcares redutores está alta no sangue? Por que a galactose aparece na urina?

Caso C O paciente se queixa de câibras musculares doloridas quando executa exercício físico extenuante, mas não tem outros sintomas. Uma biópsia de músculo indica concentração de glicogênio muito mais alta do que o normal. Por que o glicogênio se acumula?

Caso D A paciente está letárgica, seu fígado está aumentado e uma biópsia do órgão mostra quantidade excessiva de glicogênio. Ela também tem um nível de glicose sanguínea mais baixo do que o normal. Qual é a razão para a baixa glicemia nesta paciente?

Enzima com defeito

- (a) PFK-1 muscular
- (b) Fosfomanose-isomerase
- (c) Galactose-1-fosfato-uridil-transferase
- (d) Glicogênio-fosforilase hepática
- (e) Triose-cinase
- (f) Lactase da mucosa intestinal
- (g) Maltase da mucosa intestinal
- (h) Enzima de desramificação muscular

Tratamento

- 1. Corrida diária de 5 km
- 2. Dieta livre de gorduras
- 3. Dieta com baixa lactose
- 4. Evitar exercícios extenuantes
- 5. Altas doses de niacina (o precursor de NAD^+)
- 6. Alimentação frequente (pequenas porções) de uma dieta normal

**12. Efeitos da insuficiência de insulina em uma pessoa diabética**

Um homem com diabetes dependente de insulina é levado à emergência em estado quase comatoso. Enquanto passava férias em um local isolado, ele perdeu a medicação de insulina e estava há dois dias sem tomar o hormônio.

- (a) Para cada tecido listado a seguir, indique a velocidade de cada uma das vias (mais rápida, mais lenta, ou inalterada) neste paciente, em comparação com o nível normal obtido quando são administradas quantidades apropriadas de insulina ao paciente.
- (b) Para cada via, descreva pelo menos um mecanismo de controle responsável pela mudança prevista.

Tecido e vias

- 1. Adiposo: síntese de ácidos graxos
- 2. Muscular: glicólise; síntese de ácidos graxos; síntese de glicogênio
- 3. Hepático: glicólise; gliconeogênese; síntese de glicogênio; síntese de ácidos graxos; via das pentoses-fosfato

**13. Metabólitos sanguíneos na insuficiência de insulina**

Prediga, para o paciente descrito no Problema 12, os níveis dos seguintes metabólitos no seu sangue *antes* do tratamento na emergência em relação aos níveis mantidos durante um tratamento adequado com insulina: (a) glicose; (b) corpos cetônicos; (c) ácidos graxos livres.

14. Efeitos metabólicos de enzimas mutantes Prediga e explique o efeito de cada um dos seguintes defeitos, causados por mutações, sobre o metabolismo do glicogênio: (a) perda do sítio de ligação ao cAMP na subunidade reguladora da proteína-cinase A (PKA); (b) perda do inibidor da fosfoproteína-fosfatase (inibidor 1 na Figura 15-42); (c) superexpressão da fosforilase-cinase *b* no fígado; (d) receptores de glucagon defeituosos no fígado.

15. Controle hormonal do metabolismo energético Entre o seu jantar e o café da manhã, sua glicose sanguínea diminui e seu fígado torna-se um produtor de glicose, em vez de consumidor. Descreva a base hormonal para essa troca e explique como a mudança hormonal desencadeia a produção de glicose pelo fígado.

16. Metabolismo alterado em camundongos modificados geneticamente Os pesquisadores podem modificar os genes de um camundongo de forma que um único gene em um

único tecido produz ou uma proteína inativa (camundongo nocaute) ou uma proteína sempre (constitutivamente) ativa. Que efeitos sobre o metabolismo podem ser previstos para camundongos com as seguintes alterações genéticas? (a) nocaute da enzima de desramificação do glicogênio no fígado; (b) nocaute da hexocinase IV no fígado; (c) nocaute da FBPase-2 no fígado; (d) FBPase-2 constitutivamente ativa no fígado; (e) AMPK constitutivamente ativa no músculo; (f) ChREBP constitutivamente ativo no fígado.

Problema de análise de dados

17. Estrutura ótima do glicogênio As células musculares precisam de acesso rápido a grandes quantidades de glicose durante o exercício intenso. Esta glicose é armazenada no fígado e no músculo esquelético na forma polimérica como partículas de glicogênio. A partícula típica contém cerca de 55.000 resíduos de glicose (ver Figura 15-35b). Meléndez-Hevia, Waddell e Shelton (1993) investigaram alguns aspectos teóricos da estrutura do glicogênio, conforme descrito neste problema.

- (a) A concentração celular de glicogênio no fígado é de cerca de $0,01 \mu\text{M}$. Qual a concentração celular de glicose livre necessária para armazenar uma quantidade equivalente de glicose? Por que essa concentração de glicose livre representa um problema para a célula?

A glicose é liberada do glicogênio pela glicogênio-fosforilase, enzima que pode remover moléculas de glicose, uma de cada vez, da extremidade de uma cadeia de glicogênio. As cadeias de glicogênio são ramificadas (ver Figuras 15-28 e 15-35b), e o grau de ramificação – o número de ramificações por cadeia – tem uma influência poderosa sobre a velocidade com que a glicogênio-fosforilase libera glicose.

- (b) Por que um grau de ramificação muito baixo (i.e., abaixo de um nível ótimo) reduz a velocidade de liberação de glicose? (Dica: considere o caso extremo de uma cadeia não ramificada com 55.000 resíduos de glicose.)
- (c) Por que um grau de ramificação muito alto também reduz a velocidade de liberação de glicose? (Dica: pense nas restrições físicas.)

Meléndez-Hevia e colaboradores fizeram uma série de cálculos e chegaram à conclusão de que duas ramificações por cadeia (ver Figura 15-35b) são o número ótimo para as restrições descritas acima. Isso é o que se encontra no glicogênio armazenado no músculo e no fígado.

Para determinar o número ótimo de resíduos de glicose por cadeia, Meléndez-Hevia e colaboradores consideraram dois parâmetros-chave que definem a estrutura de uma partícula de glicogênio: t = número de camadas de cadeias de glicose em uma partícula (a molécula da Figura 15-35b tem cinco camadas); g_c = número de resíduos de glicose em cada cadeia. Eles decidiram encontrar os valores de t e g_c que poderiam maximizar três quantidades: (1) a quantidade de glicose armazenada na partícula (G_T) por unidade de volume; (2) o número de cadeias de glicose não ramificadas (C_A) por unidade de volume (i.e., o número de cadeias na camada mais externa, acessível à glicogênio-fosforilase); e (3) a quantidade de glicose disponível para a fosforilase nestas cadeias não ramificadas (G_{PT}).

- (d) Demonstre que $C_A = 2^{t-1}$. Esse é o número de cadeias disponíveis para a glicogênio-fosforilase antes da ação da enzima de desramificação.

- (e) Demonstre que C_T , o número total de cadeias na partícula, é dado por $C_T = 2^t - 1$. Assim, $G_T = g_c(C_T) = g_c(2^t - 1)$, o número total de resíduos de glicose na partícula.
- (f) A glicogênio-fosforilase não pode remover resíduos de glicose de cadeias de glicogênio que tenham menos de cinco resíduos. Demonstre que $G_{PT} = (g_c - 4)(2^{t-1})$. Essa é a quantidade de glicose disponível para a glicogênio-fosforilase.
- (g) Com base no tamanho dos resíduos de glicose e na localização das ramificações, a espessura de uma camada de glicogênio é $0,12 g_c \text{ nm} + 0,35 \text{ nm}$. Mostre que o volume de uma partícula, V_s , é dado pela equação $V_s = \frac{4}{3}\pi t^3 (0,12 g_c + 0,35)^3 \text{ nm}^3$.

Meléndez-Hevia e colaboradores determinaram, então, os valores ótimos de t e g_c – aqueles que dão o valor

máximo para uma função de qualidade, que maximiza G_T ,

C_A e G_{PT} , enquanto minimiza V_s : $f = \frac{G_T C_A G_{PT}}{V_s}$. Eles cons-

tatarem que o valor ótimo de g_c é independente de t .

- (h) Escolha um valor de t entre 5 e 15 para encontrar o valor máximo de g_c . Como esse valor é comparado com o de g_c encontrado no glicogênio hepático (ver Figura 15-35b)? (Dica: talvez seja útil usar um programa de planilha de dados.)

Referência

Meléndez-Hevia, E., T.G. Waddell e E.D. Shelton. 1993. Optimization of molecular design in the evolution of metabolism: the glycogen molecule. *Biochem. J.* 295:477–483.

Ciclo do ácido cítrico

16.1 Produção de acetil-CoA (acetato ativado) 619

16.2 Reações do ciclo do ácido cítrico 624

16.3 Regulação do ciclo do ácido cítrico 640

Como foi visto no Capítulo 14, algumas células obtêm energia (ATP) pela fermentação, degradando a glicose na ausência de oxigênio. Para a maioria das células eucarióticas e muitas bactérias, que vivem em condições aeróbicas e oxidam os combustíveis orgânicos a dióxido de carbono e água, a glicólise é apenas a primeira etapa para a oxidação completa da glicose. Em vez de ser reduzido a lactato, etanol ou algum outro produto da fermentação, o piruvato produzido pela glicólise é posteriormente oxidado a H_2O e CO_2 . Essa fase aeróbica do catabolismo é chamada de **respiração**. No sentido fisiológico ou macroscópico mais amplo, respiração alude à captação de O_2 e à eliminação de CO_2 por organismos multicelulares. Bioquímicos e biólogos celulares, entretanto, utilizam esse termo em um sentido mais estrito para referirem-se ao processo molecular por meio do qual as células consomem O_2 e produzem CO_2 – processo mais precisamente denominado **respiração celular**.

A respiração celular acontece em três estágios principais (**Figura 16-1**). No primeiro, moléculas combustíveis orgânicas – glicose, ácidos graxos e alguns aminoácidos – são oxidadas para produzirem fragmentos de dois carbonos, na forma do grupo acetila da acetil-coenzima A (acetil-CoA). No segundo estágio, os grupos acetila entram no ciclo do ácido cítrico, que os oxida a CO_2 ; muito da energia dessas oxidações é conservada nos transportadores de elétrons reduzidos NADH e $FADH_2$. No terceiro estágio da respiração, estas coenzimas reduzidas são oxidadas, doando prótons (H^+) e elétrons. Os elétrons são transferidos ao O_2 via uma série de moléculas carreadoras de elétrons, conhecida como cadeia respiratória, resultando na formação de água (H_2O). No curso da transferência de elétrons, a grande quantidade de energia liberada pelas reações *redox* é conservada na forma de ATP, por um processo chamado de fosforilação oxidativa (Capítulo 19). A respiração é mais complexa que a glicólise e acredita-se que tenha evoluído mais tardiamente, após o aumento dos níveis de oxigênio na atmosfera terrestre, que resultou da evolução da fotossíntese pelas cianobactérias. Como discutimos anteriormente, no Capítulo 1, o

aumento nos níveis de oxigênio representou um ponto de inflexão na história evolutiva.

Primeiro será abordada a conversão de piruvato a grupos acetila e, então, a entrada desses grupos no **ciclo do ácido cítrico**, também chamado de **ciclo do ácido tricarboxílico (CAT)** ou **ciclo de Krebs** (em homenagem ao seu descobridor, Hans Krebs). A seguir, serão examinadas as reações do ciclo e as enzimas que as catalisam. Já que os intermediários do ciclo do ácido cítrico também podem ser removidos do ciclo para funcionarem como precursores biossintéticos, serão consideradas algumas maneiras pelas quais esses intermediários são repostos. O ciclo do ácido cítrico é um pivô do metabolismo, com vias catabólicas chegando e vias anabólicas partindo, sendo cuidadosamente regulado em coordenação com outras vias.



Hans Krebs, 1900-1981
[Fonte: Keystone Pictures USA/Alamy.]

16.1 Produção de acetil-CoA (acetato ativado)

Em organismos aeróbicos, glicose e outros açúcares, ácidos graxos e a maioria dos aminoácidos são, ao final, oxidados a CO_2 e H_2O pelo ciclo do ácido cítrico e pela cadeia respiratória. Antes de entrarem no ciclo do ácido cítrico, os esqueletos de carbono dos açúcares e dos ácidos graxos são convertidos no grupo acetila da acetil-CoA, a forma na qual a maioria dos combustíveis entra no ciclo. Muitos dos esqueletos carbonados dos aminoácidos também entram no ciclo como acetato, embora muitos aminoácidos sejam degradados a outros intermediários do ciclo, como succinato e malato, os quais, então, entram no ciclo.

O piruvato gerado no citosol pela glicólise é um ponto central no metabolismo dos carboidratos, das gorduras e das proteínas. O piruvato que entra na mitocôndria, após conversão em acetil-CoA, pode ser oxidado pelo ciclo do ácido cítrico para gerar energia, ou pode ser utilizado como precursor para a síntese de ácidos graxos e esteróis. Há um terceiro destino possível para o piruvato: como precursor para a síntese de aminoácidos (Capítulo 22). Na **glicólise anaeróbica**, o piruvato não sofre uma oxidação posterior via ciclo

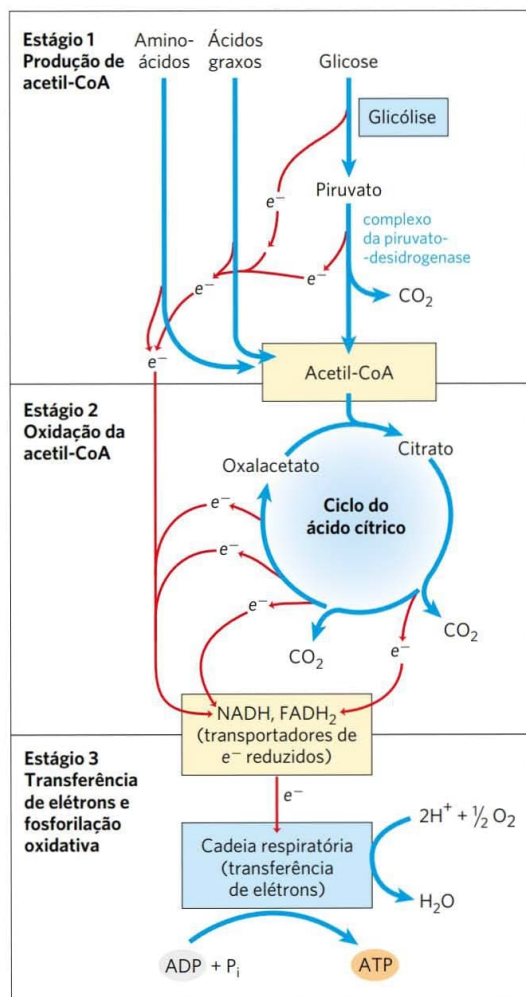


FIGURA 16-1 Catabolismo de proteínas, gorduras e carboidratos durante os três estágios da respiração celular. Estágio 1: a oxidação de ácidos graxos, glicose e alguns aminoácidos gera acetil-CoA. Estágio 2: a oxidação dos grupos acetila no ciclo do ácido cítrico inclui quatro etapas, nas quais os elétrons são removidos. Estágio 3: os elétrons carregados por NADH e FADH₂ convergem para uma cadeia de transportadores de elétrons mitocondrial (ou, em bactérias, ligados à membrana plasmática) – a cadeia respiratória –, reduzindo, no final, O₂ a H₂O. Este fluxo de elétrons impulsiona a produção de ATP.

do ácido cítrico, mesmo que haja oxigênio disponível para essa via; em vez disso, o piruvato é simplesmente reduzido a lactato no citosol, regenerando o NAD⁺ para possibilitar a continuada produção de ATP pela glicólise.



Vimos que, em muitos tipos de células cancerosas, a glicose sofre glicólise anaeróbica no citosol, com lactato como produto colateral (o efeito Warburg; ver Quadro 14-1). Uma vez que a entrada de piruvato na mitocôndria (e sua oxidação subsequente) está diminuída em tumores, o mecanismo pelo qual o piruvato penetra na mitocôndria é de grande interesse. Para entrar na matriz, o piruvato primeiro difunde-se através de aberturas na membrana mitocondrial externa e, então, é transportado através da mem-

brana interna pelo **carreador mitocondrial de piruvato (MPC)**, um transportador específico para o piruvato, que realiza transporte passivo. O MPC é codificado por dois genes, *MPC1* e *MPC2*, os quais apresentam mutações em uma alta proporção (80%) de certos cânceres, incluindo gliomas (tumores de células gliais no cérebro). Essas mutações reduzem a fração de piruvato citosólico que sofre oxidação no ciclo do ácido cítrico, e essa redução poderia, em princípio, explicar o efeito Warburg. ■

Em células normais (não tumorais), o piruvato é oxidado na matriz mitocondrial a acetil-CoA e CO₂ pelo **complexo da piruvato-desidrogenase (PDH)**. Esse complexo de enzimas altamente organizado – várias cópias de cada uma das três enzimas – está localizado na mitocôndria de todas as células eucarióticas e no citosol de bactérias.

O exame cuidadoso desse complexo enzimático é gratificante sob diversos aspectos. O complexo da PDH é um exemplo clássico e muito estudado de um complexo multienzimático no qual uma série de intermediários químicos permanece ligada às moléculas de enzimas à medida que o substrato é transformado no produto final. Cinco cofatores, quatro derivados de vitaminas, participam do mecanismo da reação. A regulação desse complexo enzimático também ilustra como uma combinação de modificações covalentes e mecanismos alostéricos resulta em um fluxo precisamente regulado em uma etapa metabólica. Por fim, o complexo da PDH é o protótipo para dois outros importantes complexos enzimáticos: α -cetoglutarato-desidrogenase, do ciclo do ácido cítrico, e desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada, das vias de oxidação de alguns aminoácidos (ver Figura 18-28). A notável semelhança na estrutura de proteínas, na exigência de cofatores e nos mecanismos de reação desses três complexos reflete inquestionavelmente uma origem evolutiva comum; eles são parálogos.

O piruvato é oxidado a acetil-CoA e CO₂

A reação geral catalisada pelo complexo da piruvato-desidrogenase é uma **descarboxilação oxidativa**, um processo de oxidação irreversível no qual o grupo carboxila é removido do piruvato na forma de uma molécula de CO₂ e os dois carbonos remanescentes são convertidos no grupo acetila da acetil-CoA (**Figura 16-2**). O NADH formado nessa reação doa um íon hidreto (:H⁻) para a cadeia respiratória (Figura 16-1), que transferirá os dois elétrons ao oxigênio ou, em microrganismos anaeróbicos, a um aceptor de elétrons alternativo, como nitrato ou sulfato. A transferência de elétrons do NADH ao oxigênio gera, ao final, 2,5 moléculas de ATP por par de elétrons. A irreversibilidade da reação do complexo da PDH foi demonstrada por experimentos com marcação isotópica: o complexo não pode ligar CO₂ radioativamente marcado à acetil-CoA para formar uma molécula de piruvato com a carboxila marcada.

O complexo da piruvato-desidrogenase requer cinco coenzimas

A combinação de desidrogenação e descarboxilação do piruvato levando ao grupo acetila da acetil-CoA (Figura 16-2) requer a ação sequencial de três enzimas diferentes e cinco

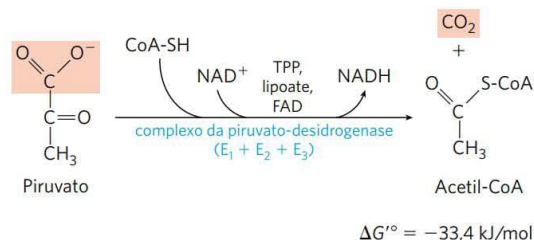


FIGURA 16-2 Reação geral catalisada pelo complexo da piruvato-desidrogenase. As cinco coenzimas participantes dessa reação e as três enzimas que formam o complexo são discutidas no texto.

coenzimas ou grupos prostéticos diferentes – pirofosfato de tiamina (TPP, do inglês, *thiamine pyrophosphate*), dinucleotídeo de flavina-adenina (FAD, do inglês, *flavin adenine dinucleotide*), coenzima A (CoA, algumas vezes denominada CoA-SH, para enfatizar a função do grupo —SH), dinucleotídeo de nicotinamida-adenina (NAD⁺, do inglês, *nicotinamide adenine dinucleotide*) e lipoato. Quatro vitaminas diferentes essenciais à nutrição humana são componentes vitais desse sistema: tiamina (no TPP), riboflavina (no FAD), niacina (no NAD⁺) e pantotenato (na CoA). Foram descritas anteriormente as funções de FAD e NAD como transportadores de elétrons (Capítulo 13) e verificou-se que o TPP era a coenzima da piruvato-descarboxilase (ver Figura 14-15).

A coenzima A (**Figura 16-3**) tem um grupo tiol reativo (—SH) que é crucial para a função da CoA como transportador de acilas em diferentes reações metabólicas. Grupos acila são covalentemente ligados ao grupo tiol, formando **tioésteres**. Devido às energias de ativação padrão relativamente altas para a hidrólise (ver Figuras 13-16, 13-17), os tioésteres têm um alto potencial para a transferência do grupo acila, ou seja, a doação desses grupos a diversas moléculas aceptoras é uma reação favorável. O grupo acila unido à coenzima A pode, portanto, ser considerado “ativado” para transferência.

O quinto cofator do complexo da PDH, o **lipoato** (**Figura 16-4**), tem dois grupos tiol que podem ser reversivelmente oxidados, produzindo uma ligação dissulfeto (—S—S—), similar àquela entre dois resíduos de Cys em uma proteína. Devido à sua capacidade de participar de reações de oxidação e redução, o lipoato atua como transportador de elétrons (hidrogênio) e como transportador de acilas, como será visto.

O complexo da piruvato-desidrogenase consiste em três enzimas distintas

O complexo da PDH contém três enzimas – **piruvato-desidrogenase** (E₁), **di-hidrolipoil-transacetilase** (E₂) e **di-hidrolipoil-desidrogenase** (E₃) – cada uma presente em várias cópias. O número de cópias de cada enzima e, portanto, o tamanho do complexo varia entre espécies. O complexo da PDH isolado de mamíferos apresenta um diâmetro de cerca de 50 nm – mais de cinco vezes o tamanho de um ribossomo inteiro e grande o suficiente para ser visto por microscopia eletrônica (**Figura 16-5a**). Na enzima bovina, 60 cópias idênticas de E₂ formam um dodecaedro pentagonal (o núcleo) com um diâmetro de aproximadamente 25 nm (Figura 16-5b). (O núcleo da enzima de *Escherichia coli* contém 24 cópias de E₂.) E₂ é o ponto de conexão para o grupo prostético lipoato, unido ao grupo ε-amino de um resíduo de Lys por uma ligação amida (Figura 16-4). E₂ tem três domínios funcionalmente distintos (Figura 16-5c): o *domínio lipoil* na porção aminoterminal, contendo o(s) resíduo(s) de lipoil-Lys; o *domínio de ligação* a E₁ e E₃ na porção central; e o *domínio aciltransferase* na porção central mais interna, o qual contém o sítio ativo da aciltransferase. O complexo da PDH de levedura tem um único domínio lipoil, com um lipoato ligado, mas o complexo em mamíferos tem dois e, em *E. coli*, três (Figura 16-5c). Os domínios de E₂ são separados por conectores, sequências de 20 a 30 resíduos de aminoácidos, ricos em Ala e Pro e intercalados com

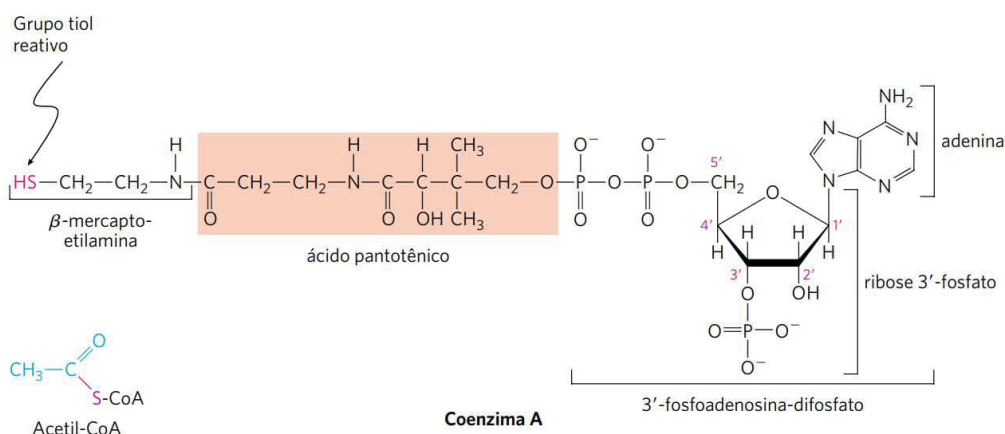


FIGURA 16-3 Coenzima A (CoA). Um grupo hidroxila do ácido pantotênico está unido a uma molécula de ADP modificada por uma ligação fosfoéster, e seu grupo carboxila está ligado à β-mercaptopetilamina por uma ligação amida. O grupo hidroxila na posição 3' da molécula de ADP tem um grupo fosfato que não está presente no ADP livre. O grupo —SH da molécula de mercaptopetilamina forma um tioéster com o acetato para formar acetil-coenzima A (acetil-CoA) (à esquerda, embaixo).

o grupo hidroxietila é oxidado ao nível de um ácido carboxílico (acetato). Os dois elétrons removidos nessa reação reduzem a ligação —S—S— de um grupo lipoila em E_2 a dois grupos tiol (—SH). A acetila produzida nesta reação de oxidação-redução é primeiramente esterificada a um dos grupos —SH do lipoil e, então, transesterificada à CoA para formar acetil-CoA (etapa 3). Desse modo, a energia da oxidação impulsiona a formação de um tioéster de acetato altamente energético. As reações remanescentes catalisadas pelo complexo da PDH (por E_3 , nas etapas 4 e 5) são transferências de elétrons necessárias para a regeneração da forma oxidada (dissulfeto) do grupo lipoil de E_2 , preparando o complexo enzimático para um novo ciclo de oxidação. Os elétrons removidos do grupo hidroxietila derivado do piruvato são passados ao NAD^+ pelo FAD.

Essenciais ao mecanismo do complexo da PDH são os braços flexíveis de lipoil-lisina de E_2 , que recebem os dois elétrons e o grupo acetila (resultantes do piruvato) de E_1 e os passam a E_3 . Todas essas enzimas e coenzimas estão agrupadas, permitindo que os intermediários reajam rapidamente sem se afastarem da superfície do complexo enzimático. A sequência de cinco reações mostrada na Figura 16-6 é, assim, um exemplo de **canalização do substrato**. Os intermediários da sequência em múltiplas etapas nunca deixam o complexo, e a concentração local do substrato de E_2 é mantida muito alta. A canalização também evita o “roubo” do grupo acetila ativado por outras enzimas que utilizam esse grupo como substrato. Como será visto, um mecanismo similar de aprisionamento para a canalização do substrato entre sítios ativos é utilizado por algumas outras enzimas, com lipoato, biotina ou moléculas similares à CoA servindo como cofatores.



Como pode ser previsto, mutações nos genes das subunidades do complexo da PDH, ou uma deficiência de tiamina na dieta, podem ter graves consequências. Animais com deficiência de tiamina são incapazes de oxidar o piruvato normalmente. Isso é especialmente importante para o cérebro, que costuma obter toda sua energia por meio da oxidação aeróbica da glicose, em uma via que necessariamente inclui a oxidação do piruvato. O beribéri, doença resultante da deficiência de tiamina, caracteriza-se pela perda de função neural. Essa doença ocorre principalmente em populações cuja dieta consiste basicamente em arroz branco (polido), que carece da casca onde a maioria da tiamina do arroz é encontrada. Pessoas que consomem habitualmente grandes quantidades de álcool também podem desenvolver deficiência de tiamina, pois grande parte da dieta ingerida consiste em “calorias vazias”, sem vitaminas, das bebidas destiladas. Um nível de piruvato sanguíneo elevado frequentemente é um indicativo de defeitos na oxidação do piruvato devido a uma dessas causas. ■

RESUMO 16.1 Produção de acetil-CoA (acetato ativado)

- Piruvato, o produto da glicólise, é transportado para a matriz mitocondrial pelo carreador mitocondrial de piruvato.
- O piruvato é convertido em acetil-CoA, o metabólito que dá início ao ciclo do ácido cítrico, pelo complexo da piruvato-desidrogenase.
- O complexo da PDH é composto por várias cópias de três enzimas: piruvato-desidrogenase, E_1 (ligada ao co-

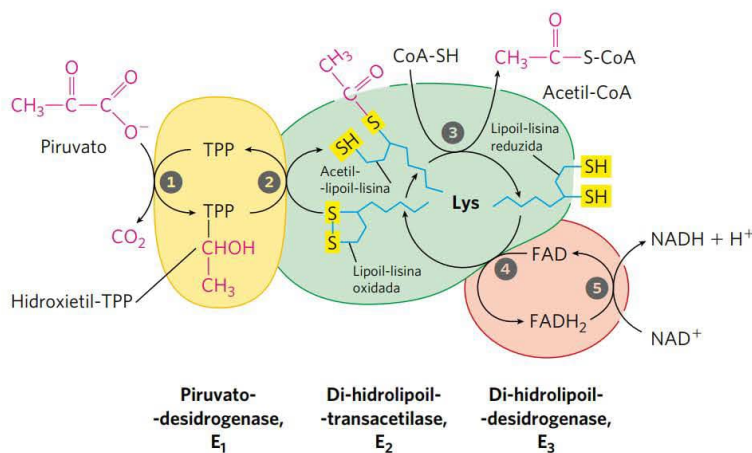


FIGURA 16-6 Descarboxilação oxidativa do piruvato a acetil-CoA pelo complexo da PDH. O destino da molécula de piruvato está ressaltado em vermelho. Na etapa 1, o piruvato reage com o pirofosfato de tiamina (TPP) ligado à piruvato-desidrogenase (E_1), sendo descarboxilado ao derivado hidroxietila (ver Figura 14-15). A piruvato-desidrogenase também processa a etapa 2, a transferência de dois elétrons e do grupo acetila a partir do TPP para a forma oxidada do grupo lipoil-lisina do centro do complexo, di-hidrolipoil-transacetilase (E_2), formando o acetil-tioéster do grupo lipoil reduzido. A etapa 3 é uma transesterificação na qual o grupo —SH da CoA substitui o grupo —SH de E_2 , produzindo acetil-CoA e a forma completamente reduzida (ditiol) do grupo lipoil. Na etapa 4, a di-hidrolipoil-desidrogenase (E_3) promove a transferência de dois átomos de hidrogênio dos grupos lipoil reduzidos de E_2 ao grupo prostético FAD de E_3 , restaurando a forma oxidada do grupo lipoil-lisina de E_2 . Na etapa 5, o FADH_2 reduzido de E_3 transfere um íon hidreto ao NAD^+ , formando NADH . O complexo enzimático está agora pronto para outro ciclo catalítico. (As cores das subunidades correspondem às da Figura 16-5b.)

fator TPP); di-hidrolipoil-transacetilase, E_2 (covalentemente ligada ao grupo lipoil); e di-hidrolipoil-desidrogenase, E_3 (com os cofatores FAD e NAD^+).

- E_1 catalisa a primeira descarboxilação do piruvato, produzindo hidroxietil-TPP, e, então, a oxidação do grupo hidroxietila a um grupo acetila. Os elétrons dessa oxidação reduzem o dissulfeto do lipoato ligado a E_2 , e o grupo acetila é transferido em uma ligação tioéster a um grupo $-\text{SH}$ do lipoato reduzido.
- E_2 catalisa a transferência do grupo acetila para a coenzima A, formando acetil-CoA.
- E_3 catalisa a regeneração da forma dissulfeto (oxidada) do lipoato; os elétrons passam primeiramente ao FAD, e, então, ao NAD^+ .
- Os braços longos de lipoil-lisina movem-se livremente entre o sítio ativo de E_1 e os sítios ativos de E_2 e E_3 , prendendo os intermediários ao complexo enzimático e possibilitando a canalização do substrato.
- A organização do complexo da PDH é muito semelhante àquela dos complexos enzimáticos que catalisam a oxidação do α -cetoglutarato e dos α -cetoácidos de cadeia ramificada.

16.2 Reações do ciclo do ácido cítrico

Agora serão focalizados os processos por meio dos quais a acetil-CoA é oxidada. Essa transformação química é realizada pelo ciclo do ácido cítrico, a primeira via *cíclica* que encontramos até aqui (**Figura 16-7**). Para iniciar uma rodada do ciclo, a acetil-CoA doa seu grupo acetila ao composto de quatro carbonos oxalacetato, formando o composto de seis carbonos citrato. O citrato é, em seguida, transformado em isocitrato, também uma molécula com seis carbonos, o qual é desidrogenado com a perda de CO_2 para produzir o composto de cinco carbonos α -cetoglutarato (também chamado de oxoglutarato). O α -cetoglutarato perde uma segunda molécula de CO_2 , originando ao final o composto de quatro carbonos succinato. O succinato é, então, convertido por três etapas enzimáticas ao composto de quatro carbonos oxalacetato – que está, assim, pronto para reagir com outra molécula de acetil-CoA. Em cada rodada do ciclo entra um grupo acetila (dois carbonos) na forma de acetil-CoA, e são removidas duas moléculas de CO_2 ; uma molécula de oxalacetato é utilizada para a formação do citrato e uma molécula de oxalacetato é regenerada. Não ocorre nenhuma remoção líquida de oxalacetato; teoricamente, uma molécula de oxalacetato pode participar da oxidação de um número infinito de grupos acetila, e, na verdade, o oxalacetato está presente nas células em concentrações muito baixas. Quatro das oito etapas deste processo são oxidações, nas quais a energia da oxidação é conservada de maneira muito eficiente na forma das coenzimas reduzidas NADH e FADH_2 .

Como mencionado antes, embora o ciclo do ácido cítrico seja fundamental ao metabolismo gerador de energia, sua função não está limitada à conservação energética. Intermediários do ciclo com quatro e cinco carbonos servem como precursores para uma ampla variedade de produtos. Para repor os intermediários removidos com este propósito, as

células utilizam reações anapleróticas (de reposição), as quais são descritas a seguir.

Eugene Kennedy e Albert Lehninger mostraram, em 1948, que, em eucariotos, o conjunto inteiro das reações do ciclo do ácido cítrico acontece na mitocôndria. Foi mostrado que as mitocôndrias isoladas não apenas continham todas as enzimas e coenzimas necessárias para o ciclo do ácido cítrico, mas também todas as enzimas e proteínas necessárias para o último estágio da respiração – a transferência de elétrons e a síntese de ATP pela fosforilação oxidativa. Como será visto nos capítulos posteriores, a mitocôndria também contém as enzimas para a conversão de ácidos graxos e alguns aminoácidos em acetil-CoA e para a conversão oxidativa de outros aminoácidos em α -cetoglutarato, succinil-CoA ou oxalacetato. Dessa maneira, em eucariotos não fotossintéticos, a mitocôndria é o local onde ocorre a maioria das reações oxidativas geradoras de energia e a síntese acoplada de ATP. Em eucariotos fotossintéticos, a mitocôndria é o principal local de produção de ATP no escuro, porém, à luz do dia, os cloroplastos geram a maior parte do ATP desses organismos. Em muitas bactérias, as enzimas do ciclo do ácido cítrico estão no citosol, e a membrana plasmática desempenha uma função semelhante àquela da membrana mitocondrial interna para a síntese de ATP (Capítulo 19).

A sequência das reações do ciclo do ácido cítrico é quimicamente lógica

A acetil-CoA produzida pela quebra de carboidratos, gorduras e proteínas deve ser completamente oxidada a CO_2 para que o máximo da energia potencial possa ser extraído desses combustíveis. No entanto, a oxidação direta do acetato (ou da acetil-CoA) a CO_2 não é bioquimicamente possível. A descarboxilação desse ácido com dois carbonos produziria CO_2 e metano (CH_4). O metano é quimicamente estável, e, com exceção de certas bactérias metanotróficas que crescem em nichos ricos em metano, os organismos não possuem os cofatores e as enzimas necessários para a oxidação do metano. Os grupos metileno ($-\text{CH}_2-$), entretanto, são prontamente metabolizados pelos sistemas enzimáticos presentes na maioria dos organismos. Nas típicas sequências de oxidação, estão envolvidos dois grupos metileno adjacentes ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), sendo pelo menos um deles adjacente a um grupo carbonila. Como observado no Capítulo 13 (p. 503), os grupos carbonila são particularmente importantes nas transformações químicas das rotas metabólicas. O carbono do grupo carbonila tem uma carga parcial positiva devida à capacidade de atrair elétrons do oxigênio da carbonila, e este grupo é, portanto, um centro eletrofílico. Um grupo carbonila pode facilitar a formação de um carbânion em um carbono adjacente pelo deslocamento da carga negativa do carbânion. O ciclo do ácido cítrico mostra um exemplo da oxidação de um grupo metileno quando o succinato é oxidado (etapas 6 a 8 na Figura 16-7), formando um grupo carbonila (no oxalacetato) que é quimicamente mais reativo do que o metano ou um grupo metileno.

Em resumo, para a acetil-CoA ser oxidada de maneira eficiente, o seu grupo metila deve estar ligado a alguma coi-

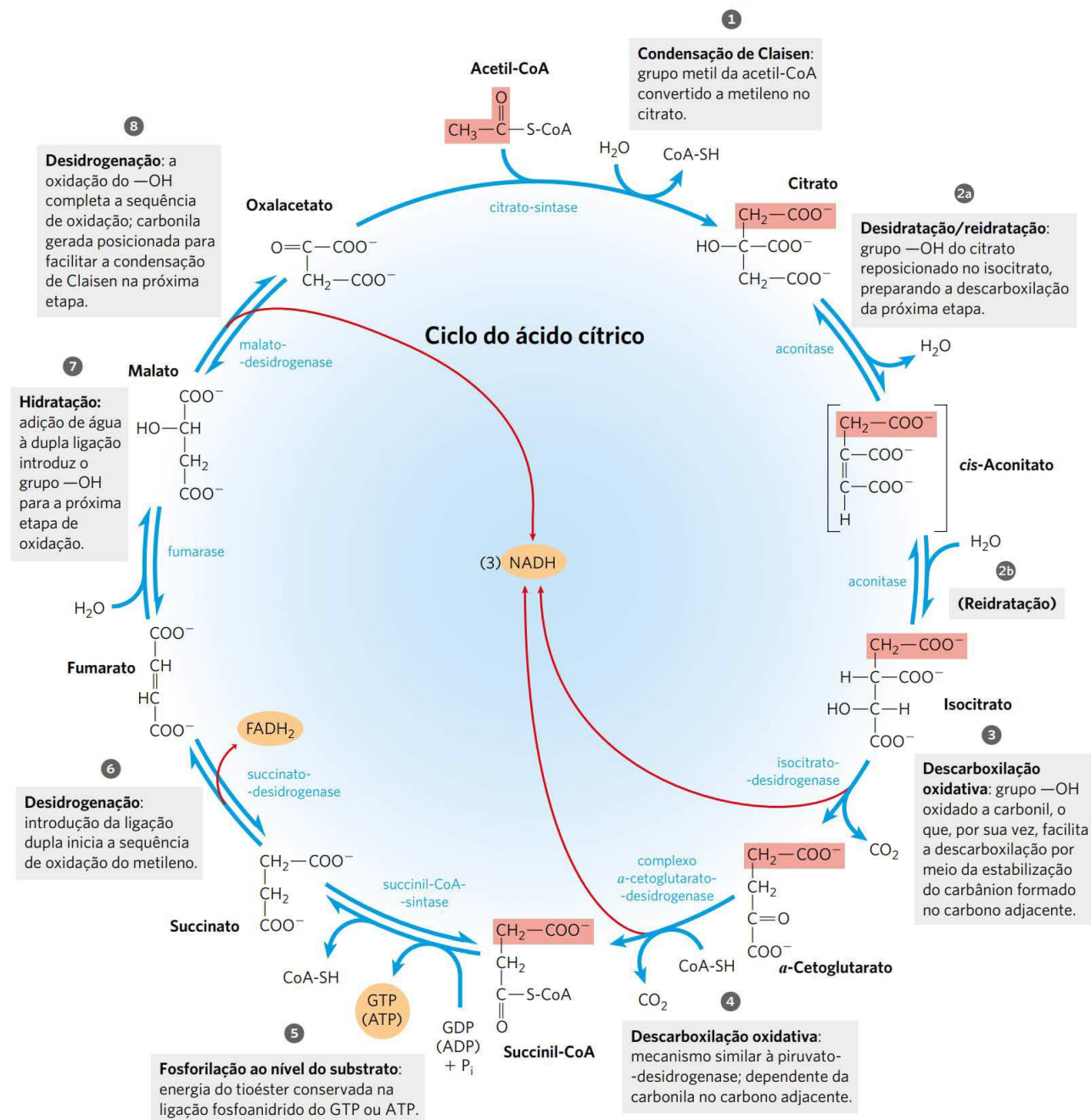


FIGURA 16-7 Reações do ciclo do ácido cítrico. Os átomos de carbono sombreados em cor salmão são aqueles derivados do acetato da acetil-CoA durante a primeira rodada do ciclo; estes *não são* os carbonos liberados na forma de CO_2 durante a primeira rodada. Observe que, no succinato e no fumarato, o grupo de dois carbonos derivado do acetato não pode mais ser especificamente indicado; como succinato e fumarato são moléculas simétricas, C-1 e C-2 são indistinguíveis de C-4 e C-3. O número ao lado de cada etapa de reação corresponde a um tópico numerado nas páginas 626 a 633. As setas em vermelho mostram onde a energia é conservada pela transferência de elétrons ao FAD ou NAD^+ , formando FADH_2 ou $\text{NADH} + \text{H}^+$. As etapas 1, 3 e 4 são essencialmente irreversíveis na célula; todas as outras etapas são reversíveis. O nucleosídeo trifosfatado produzido na etapa 5 pode ser tanto ATP quanto GTP, dependendo da isoenzima de succinil-CoA-sintase que está catalisando a reação.

sa. A primeira etapa do ciclo do ácido cítrico resolve elegantemente o problema do grupo metila pouco reativo por meio da condensação da acetil-CoA com o oxalacetato. A carbonila do oxalacetato atua como centro eletrofílico, que é ata-

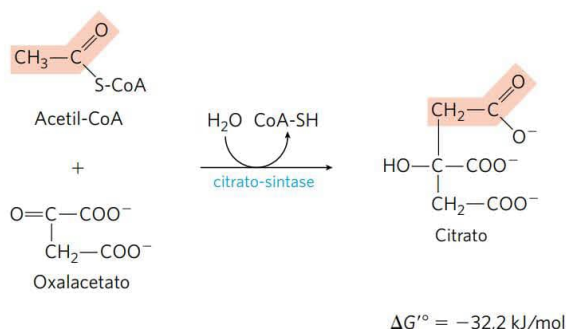
cado pelo carbono do grupo metila da acetil-CoA em uma condensação de Claisen (p. 503) para a formação do citrato (etapa 1 na Figura 16-7). O grupo metila do acetato é convertido em metileno no ácido cítrico. Esse ácido tricarboxi-

lico, então, prontamente passa por uma série de oxidações que eliminam dois carbonos na forma de CO_2 . Observe que todas as etapas levando à quebra ou à formação de ligações carbono-carbono (etapas 1, 3 e 4) dependem de grupos carbonila apropriadamente posicionados. Como em todas as rotas metabólicas, existe uma lógica química na sequência das etapas do ciclo do ácido cítrico: cada etapa envolve ou uma oxidação que conserve energia ou ela é um prelúdio necessário para a oxidação, colocando grupos funcionais em posições que facilitem a oxidação ou a descarboxilação oxidativa. À medida que for aprendendo as etapas do ciclo, lembre o raciocínio químico para cada uma; isso tornará o processo mais fácil de entender e lembrar.

O ciclo do ácido cítrico tem oito etapas

No exame das oito etapas de reação consecutivas do ciclo do ácido cítrico, será dada ênfase especial nas transformações químicas que ocorrem à medida que o citrato formado a partir de acetil-CoA e oxalacetato é oxidado, produzindo CO_2 , e em como a energia dessa oxidação é conservada nas coenzimas reduzidas NADH e FADH_2 .

1 Formação do citrato A primeira reação do ciclo é a condensação de acetil-CoA e **oxalacetato** para a formação do **citrato**, catalisada pela **citrato-sintase**:



Nessa reação, o carbono da metila do grupo acetila é unido ao grupo carbonila (C-2) do oxalacetato. Citroil-CoA é o intermediário transitoriamente formado no sítio ativo da enzima (ver Figura 16-9). Esse intermediário é rapidamente hidrolisado em CoA livre e citrato, que são liberados do sítio ativo. A hidrólise desse intermediário tioéster de alta energia torna a reação direta altamente exergônica. A grande e negativa variação de energia livre padrão da reação da citrato-sintase é fundamental para o funcionamento do ciclo, pois, como mencionado anteriormente, a concentração de oxalacetato normalmente é muito baixa. A CoA liberada nessa reação é reciclada para participar da descarboxilação oxidativa de outra molécula de piruvato pelo complexo PDH.

A citrato-sintase mitocondrial foi cristalizada e analisada por difração de raios X na presença e na ausência de substratos e inibidores (Figura 16-8). Cada subunidade dos homodímeros da enzima é um único polipeptídeo com dois domínios, um deles grande e rígido, e o outro menor e mais flexível, com o sítio ativo entre eles. Oxalacetato, o primeiro substrato a se ligar à enzima, induz uma grande alteração conformacional no domínio flexível, criando um

sítio de ligação para o segundo substrato, acetil-CoA. Quando o citroil-CoA é formado no sítio ativo da enzima, outra alteração conformacional causa a hidrólise do tioéster, liberando CoA-SH. Esse encaixe induzido da enzima, primeiro ao substrato e posteriormente ao intermediário da reação, diminui a probabilidade de que a clivagem da ligação tioéster da acetil-CoA seja prematura e improdutiva. Os estudos cinéticos da enzima são consistentes com este mecanismo bissubstrato ordenado (ver Figura 6-13). A reação catalisada pela citrato-sintase é fundamentalmente uma condensação de Claisen (p. 503), envolvendo um tioéster (acetil-CoA) e uma cetona (oxalacetato) (Figura 16-9).

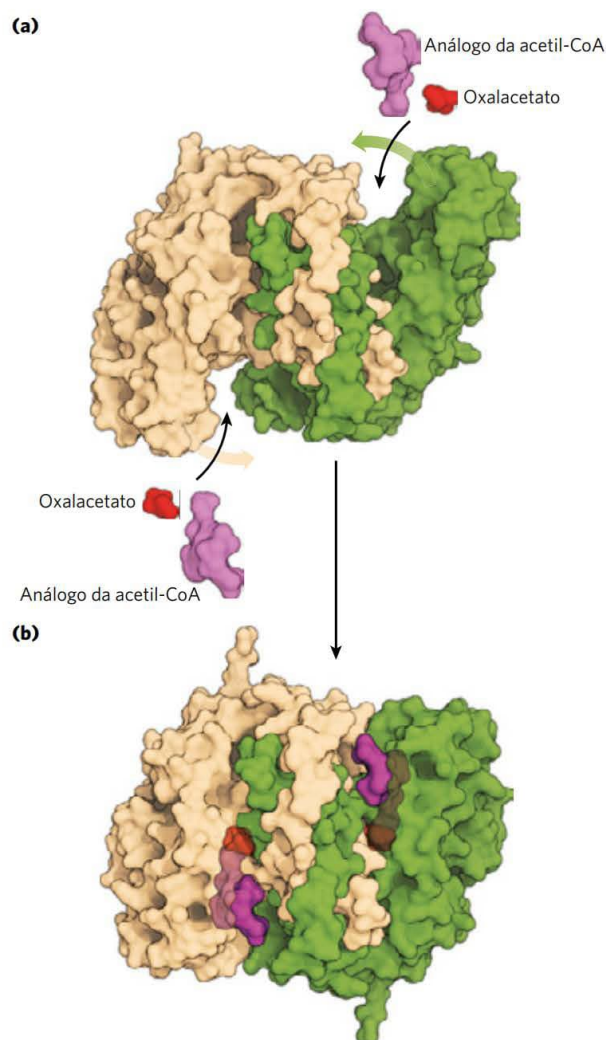
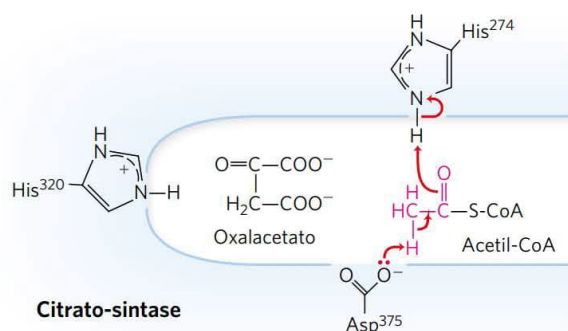


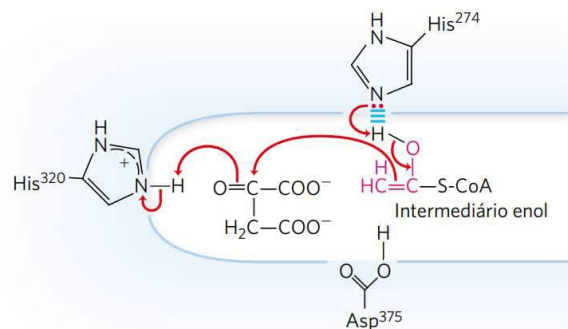
FIGURA 16-8 Estrutura da citrato-sintase. O domínio flexível de cada subunidade passa por uma grande alteração conformacional após a ligação ao oxalacetato, criando um sítio de ligação para a acetil-CoA. **(a)** Forma aberta da enzima isolada; **(b)** forma fechada ligada ao oxalacetato e a um análogo estável da acetil-CoA (carboximetil-CoA). Nestas representações, uma subunidade está colorida em bege e a outra em verde. [Fontes: (a) PDB ID 5CSC, D.-I. Liao et al., *Biochemistry* 30:6031, 1991. (b) Derivado de PDB ID 5CTS, M. Karpusas et al., *Biochemistry* 29:2213, 1990.]

2 Formação de isocitrato via *cis*-aconitato A enzima **aconitase** (mais formalmente, **aconitato-hidratase**) catalisa a transformação reversível do citrato em **isocitrato**, pela formação intermediária do ácido tricarboxílico ***cis*-aconitato**, o qual normalmente não se dissocia do sítio

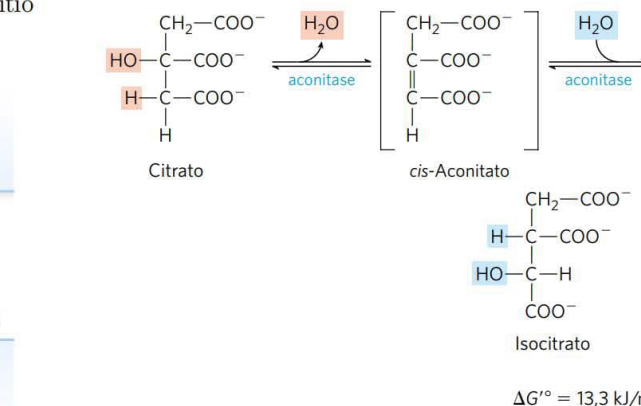
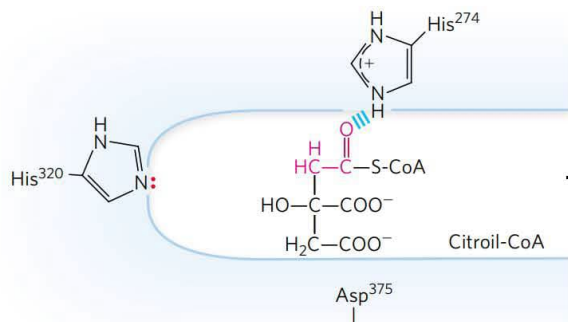
ativo. A aconitase pode promover a adição reversível de H_2O à ligação dupla do *cis*-aconitato ligado à enzima de duas maneiras diferentes, uma levando a citrato e a outra a isocitrato:



A ligação tioéster na acetil-CoA ativa os hidrogênios da metila. O Asp³⁷⁵ remove um próton do grupo metila, formando um intermediário enolato. O intermediário é estabilizado por ligações de hidrogênio e/ou protonação pela His²⁷⁴ (a protonação completa está mostrada).

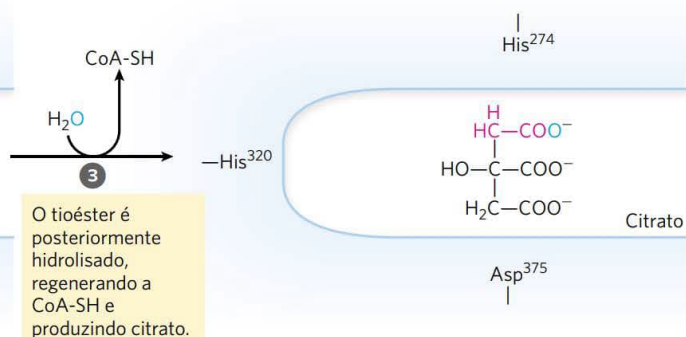


O enol(ato) rearranja-se para atacar o carbono carbonila do oxalacetato, com a His²⁷⁴ posicionada para recuperar o próton que ela previamente cedeu. A His³²⁰ atua como ácido. A condensação resultante produz citroil-CoA.



Embora a mistura em equilíbrio a pH 7,4 e 25°C contenha menos de 10% de isocitrato, na célula a reação é deslocada para a direita porque o isocitrato é rapidamente consumido na próxima etapa do ciclo, o que diminui sua concentração no estado estacionário. A aconitase contém um **centro de ferro-enxofre** (Figura 16-10), que atua tanto na ligação do substrato ao sítio ativo quanto na adição ou na remoção catalítica de H_2O . Em células exauridas de ferro, a aconitase perde o centro de ferro-enxofre e adquire uma nova função na regulação da homeostasia do ferro. A aconitase é uma de muitas enzimas caracterizadas por realizar mais de uma função (enzimas plurifuncionais) (Quadro 16-1).

MECANISMO-FIGURA 16-9 Citrato-sintase. Na reação da citrato-sintase em mamíferos, o oxalacetato liga-se primeiro, em uma sequência de reação estritamente ordenada. Esta ligação inicia uma alteração na conformação que abre o sítio de ligação para a acetil-CoA. O oxalacetato está especificamente orientado no sítio ativo da citrato-sintase pela interação de seus dois carboxilatos com dois resíduos carregados positivamente de Arg (não mostrados aqui). [Fonte: informação obtida de S. J. Remington, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2:730, 1992.]



QUADRO 16-1 Enzimas plurifuncionais (*moonlighting*): proteínas com mais de uma função

A máxima “um gene-uma enzima”, formulada por George Beadle e Edward Tatum em 1940 (ver Capítulo 24), seguiu incontestada durante grande parte do século XX, assim como ocorreu com a hipótese associada de que cada proteína possui apenas uma função. Recentemente, porém, muitas exceções admiráveis a essa simples fórmula foram descobertas – situações nas quais uma única proteína codificada por um único gene é claramente **plurifuncional**, realizando mais de uma função dentro da célula. A aconitase é uma dessas proteínas: ela atua tanto como enzima quanto como regulador da síntese proteica.

As células eucarióticas têm duas isoenzimas da aconitase. A isoenzima mitocondrial converte citrato a isocitrato no ciclo do ácido cítrico. A isoenzima citosólica possui duas funções. Ela catalisa a conversão de citrato a isocitrato, fornecendo o substrato para uma isocitrato-desidrogenase citosólica que produz NADPH com poder redutor para a síntese de ácidos graxos e outros processos anabólicos no citosol. Contudo, ela também tem uma função na homeostasia celular do ferro.

Todas as células devem obter o ferro para a atividade de muitas proteínas que o requerem como cofator. Em seres humanos, a deficiência grave de ferro resulta em anemia, em suprimento insuficiente de eritrócitos e em uma redução da capacidade transportadora de oxigênio, que podem ser fatais. O excesso de ferro também é prejudicial: ele se deposita e danifica o fígado na hemocromatose e em outras doenças. O ferro ingerido na dieta é transportado na corrente sanguínea pela proteína **transferrina** e entra nas células por meio da endocitose mediada pelo **receptor de transferrina**. Uma vez dentro da célula, o ferro é utilizado na síntese de hemes, citocromos, proteínas Fe-S e outras proteínas dependentes de Fe, e o excesso de ferro é armazenado em ligação com a proteína **ferritina**. Os níveis de transferrina, receptor de transferrina e ferritina são, portanto, cruciais para a homeostasia celular do ferro. A síntese dessas três proteínas

é regulada em resposta à disponibilidade de ferro – e a aconitase, em uma de suas funções, desempenha uma função-chave na regulação.

A aconitase tem um centro Fe-S essencial no sítio ativo (ver Figura 16-10). Quando uma célula é exaurida de ferro, esse centro Fe-S é dismantelado, e a enzima perde sua atividade como aconitase. Entretanto, a apoenzima (apoaconitase, carecendo do centro Fe-S) assim formada adquire agora sua segunda atividade – a capacidade de ligar-se a sequências específicas nos mRNA do receptor de transferrina e da ferritina, regulando, dessa forma, a síntese proteica no nível da tradução. Duas **proteínas reguladoras de ferro, IRP1 e IRP2** (do inglês, *iron regulation protein*), foram descobertas independentemente como reguladoras do metabolismo do ferro. Como provado posteriormente, IRP1 é idêntica à apoaconitase citosólica, e IRP2 é muito semelhante à IRP1 em estrutura e função, porém, ao contrário de IRP1, a IRP2 não pode ser convertida na aconitase enzimaticamente ativa. Ambas ligam-se a regiões nos mRNA que codificam a ferritina e o receptor de transferrina, com consequências sobre a mobilização e a captação de ferro. Essas sequências no mRNA fazem parte de estruturas em grampo (p. 289), chamadas de **elementos de resposta ao ferro (IRE)**, do inglês, *iron response elements*, localizadas nas extremidades 3' e 5' dos mRNA (Figura Q-1). Quando ligadas à sequência IRE da região 5' não traduzida do mRNA da ferritina, as IRP bloqueiam a síntese de ferritina; quando ligadas às sequências IRE da região 3' não traduzida do mRNA do receptor de transferrina, as IRP estabilizam o

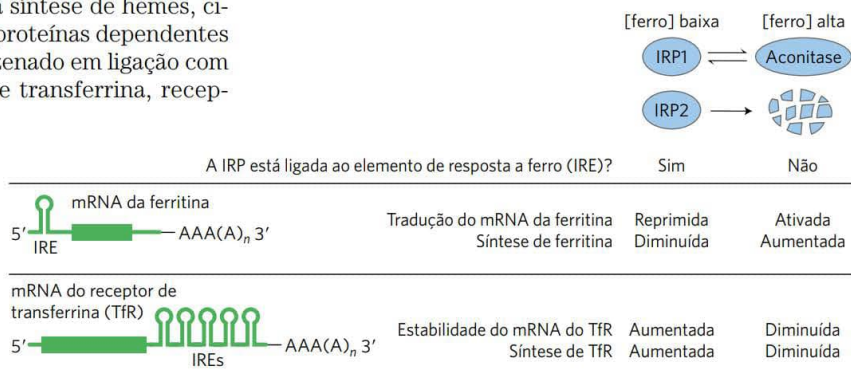


FIGURA Q-1 O efeito de IRP1 e IRP2 sobre os mRNA da ferritina e do receptor de transferrina. [Fonte: informação obtida de R. S. Eisenstein, *Annu. Rev. Nutr.* 20:627, 2000, Fig. 1.]

3 **Oxidação do isocitrato a α -cetoglutarato e CO_2** Na próxima etapa, a **isocitrato-desidrogenase** catalisa a descarboxilação oxidativa do citrato para formar **α -cetoglutarato** (Figura 16-11). O Mn^{2+} presente no sítio ativo interage com o grupo carbonila do oxalosuccinato intermediário, que é formado transitoriamente, mas só deixa o sítio ativo quando a descarboxilação o converte em α -cetoglutarato. Ele também estabiliza o enol formado transitoriamente por descarboxilação.

Em todas as células, existem duas formas diferentes de isocitrato-desidrogenase, uma que requer NAD^+ como acepo-

tor de elétrons e outra que requer NADP^+ . As reações gerais são, em outros aspectos, idênticas. Em células eucarióticas, a enzima dependente de NAD^+ encontra-se na matriz mitocondrial e participa do ciclo do ácido cítrico. A principal função da enzima dependente de NADP^+ , encontrada na matriz mitocondrial e no citosol, possivelmente seja a produção de NADPH, essencial para as vias redutoras anabólicas, como as vias de síntese de ácidos graxos e de esteróis.

4 **Oxidação do α -cetoglutarato a succinil-CoA e CO_2** A etapa seguinte é outra descarboxilação oxidativa, na qual o α -cetoglutarato

mRNA, impedindo sua degradação e possibilitando a síntese de mais cópias da proteína receptora por molécula de mRNA. Assim, em células com deficiência de ferro, a captação de ferro torna-se mais eficiente, e o armazenamento de ferro (ligado à ferritina) é reduzido. Quando a concentração celular de ferro retorna aos níveis normais, IRP1 é convertida em aconitase, e IRP2 é degradada por proteólise, encerrando a resposta aos baixos níveis de ferro.

A aconitase enzimaticamente ativa e a apoaconitase com atividade reguladora (na segunda jornada de trabalho da proteína) apresentam estruturas diferentes. Como aconitase ativa, a proteína tem dois lóbulos que se fecham ao redor do agrupamento Fe-S; como IRP1, os dois lóbulos abrem-se, expondo o sítio de ligação ao mRNA (Figura Q-2).

A aconitase é apenas uma de uma lista crescente de enzimas conhecidas (ou presumidas) por realizarem uma segunda função. Muitas das enzimas glicolíticas estão incluídas nesse grupo. A piruvato-cinase atua no núcleo para regular a transcrição de genes responsivos ao hormônio da tireoide. A gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase atua tanto como uracila-DNA-glicosilase, efetuando o reparo de DNA danificado, quanto como regulador da transcrição da histona H2B. O cristalino dos olhos dos vertebrados apresenta algumas enzimas glicolíticas multifuncionais, incluindo a fosfoglicerato-cinase, triose-fosfato-isomerase e lactato-desidrogenase. O fenômeno pelo qual proteínas podem ser utilizadas para mais de uma função é algumas vezes denominado compartilhamento gênico: duas proteínas diferentes, com diferentes papéis funcionais, são codificadas por um único gene. A máxima de Beadle e Tatum, “um gene-uma enzima”, como muitas outras ideias na ciência, é verdadeira apenas até certo ponto.

Até recentemente, a descoberta de que uma proteína tem mais de uma função era principalmente uma questão de sorte: dois grupos de pesquisadores estudando duas questões não relacionadas descobriam que “suas” proteínas tinham propriedades similares, compararam-nas cuidadosamente e descobriam que elas eram idênticas. Com o crescimento das bases de dados com sequências de DNA e de proteínas anotadas, os pesquisadores agora podem investigar deliberadamente a multifuncionalidade das proteínas, procurando nas bases de dados por qualquer outra proteína com a mesma sequência que a proteína sob estudo, porém com função diferente. Isso

também significa que uma proteína anotada nas bases de dados como exercendo uma determinada função não necessariamente tenha *apenas* aquela função. O conhecimento de proteínas com mais de uma função também pode explicar alguns resultados intrigantes: experimentos nos quais uma proteína com uma função conhecida é inativada por uma mutação, porém os organismos mutantes resultantes apresentam um fenótipo sem uma relação óbvia com aquela função.

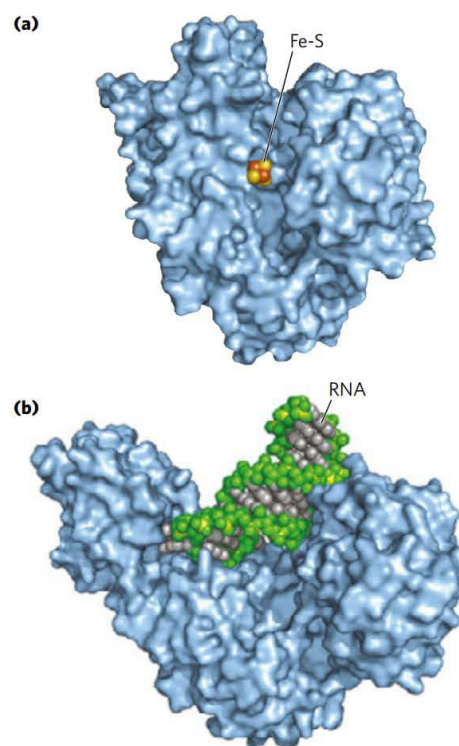
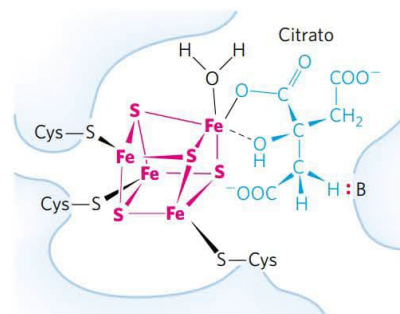
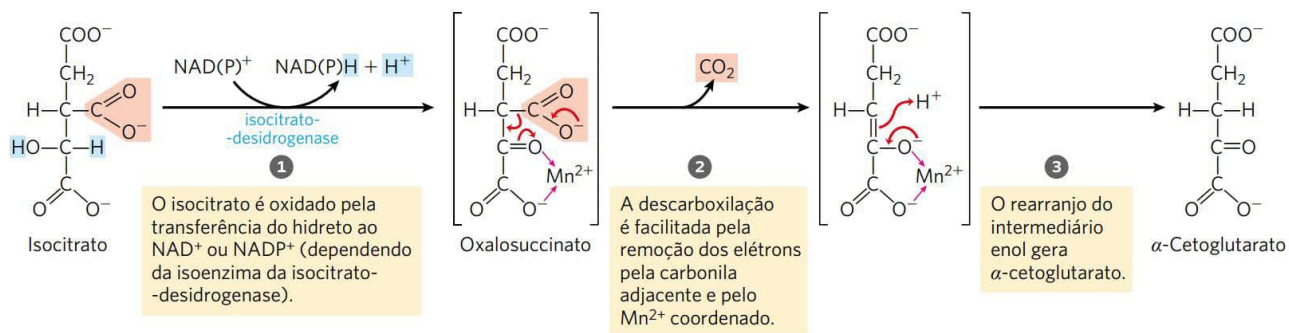


FIGURA Q-2 As duas formas da aconitase/IRP1 citosólica com duas funções distintas. **(a)** Na aconitase, os dois lóbulos principais estão fechados e o agrupamento Fe-S está completamente coberto; a proteína está representada de forma transparente para exibir o agrupamento Fe-S. **(b)** Na IRP1, os lóbulos abrem-se, expondo um sítio de ligação à estrutura em grampo do mRNA do substrato. [Fontes: (a) PDB ID 2B3Y, J. Dupuy et al., *Structure* 14:129, 2006. (b) PDB ID 2IPY, W. E. Walden et al., *Science* 314:1903, 2006.]

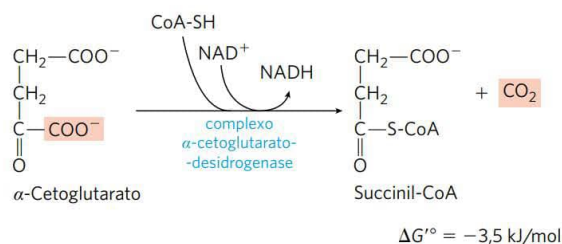
FIGURA 16-10 Centro de ferro-enxofre da aconitase. O centro de ferro-enxofre está em vermelho, e a molécula de citrato está em azul. Três resíduos de Cys da enzima ligam três átomos de ferro; o quarto ferro está ligado a um dos grupos carboxila do citrato e interage não covalentemente com um grupo hidroxila do citrato (ligação tracejada). Um resíduo básico (:B) na enzima auxilia no posicionamento do citrato no sítio ativo. O centro de ferro-enxofre atua na ligação do substrato e na catálise. As propriedades gerais das proteínas ferro-enxofre estão discutidas no Capítulo 19 (ver Figura 19-5).





MECANISMO-FIGURA 16-11 Isocitrato-desidrogenase. Nesta reação, o substrato, isocitrato, perde um carbono por descarboxilação oxidativa. Ver Figura 14-14 para mais informações sobre reações de transferência de hidretos envolvendo NAD^+ e NADP^+ .

é convertido a **succinil-CoA** e CO_2 pela ação do **complexo da α -cetoglutarato-desidrogenase**; NAD^+ é o aceptor de elétrons e CoA é o transportador do grupo succinila. A energia da oxidação do α -cetoglutarato é conservada pela formação da ligação tioéster da succinil-CoA:



Essa reação é essencialmente idêntica à reação da piruvato-desidrogenase, discutida anteriormente, e à sequência de reações responsável pela degradação dos aminoácidos com cadeia ramificada (**Figura 16-12**). O complexo da α -cetoglutarato-desidrogenase é bastante semelhante

ao complexo da PDH em estrutura e função. O complexo α -cetoglutarato-desidrogenase incorpora três enzimas homólogas às enzimas E_1 , E_2 e E_3 do complexo da PDH e contém TPP e lipoato ligado à enzima, FAD, NAD^+ e coenzima A. Ambos os complexos são certamente derivados de um ancestral evolutivo comum. Embora os componentes E_1 dos dois complexos sejam estruturalmente similares, suas sequências de aminoácidos diferem e, naturalmente, eles apresentam especificidades de ligação diferentes: E_1 do complexo da PDH liga-se ao piruvato, e E_1 do complexo da α -cetoglutarato-desidrogenase liga-se ao α -cetoglutarato. Os componentes E_2 dos dois complexos também são muito similares, ambos contendo lipoil ligado covalentemente. As subunidades E_3 são idênticas nos dois complexos enzimáticos. O complexo que degrada α -cetoácidos com cadeias ramificadas catalisa a mesma sequência de reações utilizando os mesmos cinco cofatores. Este é um caso claro de duplicação gênica e subsequente **evolução divergente**, como descrito na Figura 1-34. Por exemplo, se o complexo da PDH evoluiu primeiro, a duplicação de genes codificando

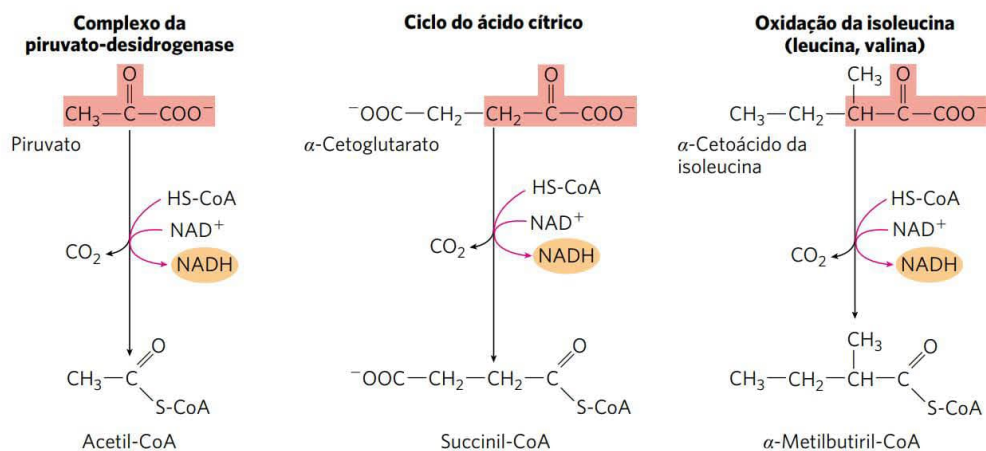
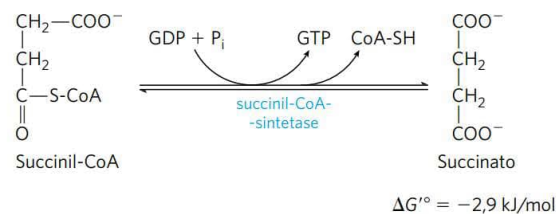


FIGURA 16-12 Um mecanismo conservado para a descarboxilação oxidativa. As rotas mostradas empregam os mesmos cinco cofatores (pirofosfato de tiamina, coenzima A, lipoato, FAD e NAD^+), complexos multienzimáticos muito parecidos, e o mesmo mecanismo enzimático para efetuar descarboxilações oxidativas do piruvato (pelo complexo da piruvato-desidrogenase), do α -cetoglutarato (no ciclo do ácido cítrico) e do esqueleto de carbono dos três aminoácidos ramificados, isoleucina (mostrado aqui), leucina e valina. Uma quarta reação, catalisada pela glicina-descarboxilase, envolve um mecanismo muito semelhante (ver Figura 20-49).

E_1 e E_2 teria fornecido “cópias extras” que poderiam sofrer mutações ao longo do tempo. As mutações, por fim, teriam levado a uma enzima usando o mesmo mecanismo para a descarboxilação oxidativa, mas com nova especificidade quanto ao substrato (pelo α -cetoglutarato), que ofereceu uma vantagem seletiva. Essas enzimas “primas” podem empregar a mesma subunidade E_3 , pois o substrato para E_3 – um lipoato reduzido – é o mesmo em ambos os complexos.

5 Conversão de succinil-CoA em succinato A succinil-CoA, como a acetil-CoA, tem uma ligação tioéster com uma energia livre padrão de hidrólise grande e negativa ($\Delta G'^\circ$ de cerca de -36 kJ/mol). Na próxima etapa do ciclo do ácido cítrico, a energia liberada pelo rompimento dessa ligação é utilizada para impelir a síntese de uma ligação fosfoanidrido no GTP

ou no ATP, com um $\Delta G'^\circ$ de apenas $-2,9$ kJ/mol. O **succinato** é formado neste processo:



A enzima que catalisa essa reação reversível é chamada de **succinil-CoA-sintetase** ou **succinato-tiocinase**; ambos os nomes indicam a participação de um nucleosídeo trifosfatado na reação (Quadro 16-2).

QUADRO 16-2 Sintases e sintetases; ligases e liases; cinases, fosfatases e fosforilases: sim, os nomes são confusos!

A citrato-sintase é uma das muitas enzimas que catalisam reações de condensação, que geram um produto quimicamente mais complexo do que os precursores. As **sintases** catalisam reações de condensação que não exigem nucleosídeos trifosfatados (ATP, GTP, etc) como fonte de energia. As **sintetases** catalisam reações de condensação que, *de fato*, utilizam ATP ou outro nucleosídeo trifosfatado como uma fonte de energia para a reação sintética. A succinil-CoA-sintetase é uma dessas enzimas. As **ligases** (do latim, *ligare*, “amarrar”) são enzimas que catalisam reações de condensação nas quais dois átomos são unidos, utilizando ATP ou outra fonte de energia. (Portanto, sintetases são ligases.) A DNA-ligase, por exemplo, conserta quebras em moléculas de DNA, utilizando energia suprida por ATP ou NAD^+ ; essa enzima é largamente utilizada na engenharia genética para unir pedaços de DNA. Ligases não devem ser confundidas com **liases**, enzimas que catalisam clivagens (ou, na reação inversa, adições), nas quais ocorrem rearranjos eletrônicos. O complexo da PDH, que remove oxidativamente CO_2 da molécula de piruvato em uma reação de oxidação, é um membro da ampla classe das liases.

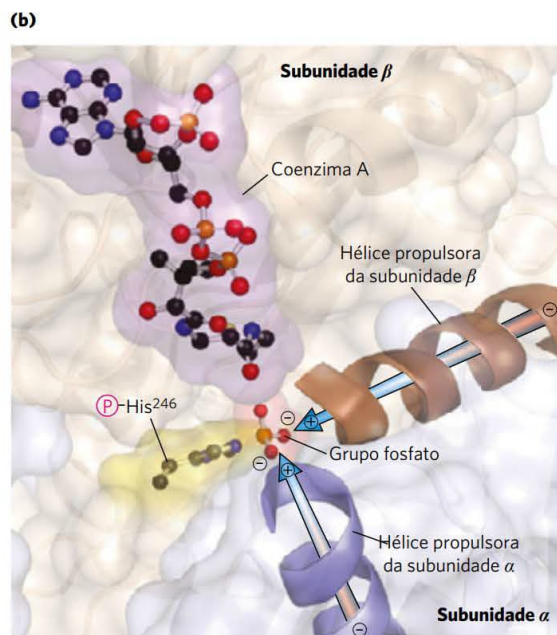
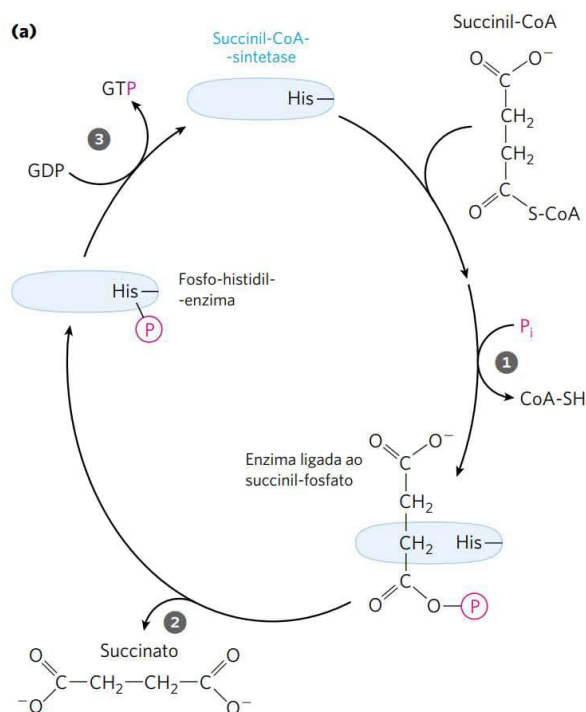
O nome **cinase** é aplicado a enzimas que transferem um grupo fosfato de um nucleosídeo trifosfatado, como o ATP, para uma molécula aceptora – um açúcar (como a hexocinase e a glicocinase), uma proteína (como a glicogênio-fosforilase-cinase), outro nucleotídeo (como a nucleosídeo-difosfato-cinase) ou um intermediário metabólico, como o oxalacetato (como a PEP-carboxicinas). A reação catalisada por uma cinase é uma **fosforilação**. Por outro lado, a **fosforólise** é uma reação de substituição, na qual o fosfato inorgânico ataca uma ligação química e é covalentemente ligado à molécula no ponto de quebra da ligação. Essas reações são catalisadas por **fosforilases**. A glicogênio-fosforilase, por exemplo, catalisa a fosforólise do glicogênio, produzindo glicose-1-fosfato. A **desfosforilação**, remoção de um grupo fosfato a partir de um éster de fosfato, é catalisada por **fosfatases**, que

utilizam a água como espécie atacante. A frutose-bifosfatase-1 converte frutose-1,6-bisfosfato a frutose-6-fosfato na gliconeogênese, e a fosforilase a fosfatase retira os grupos fosfato dos resíduos de fosfoserina na glicogênio-fosforilase fosforilada.

Infelizmente, essas descrições dos tipos de enzimas se sobrepõem, e muitas enzimas são comumente chamadas por dois ou mais nomes. A succinil-CoA-sintetase, por exemplo, também é chamada de succinato-tiocinase; a enzima é uma sintetase no ciclo do ácido cítrico e uma cinase quando age no sentido da síntese de succinil-CoA. Isso expõe outra fonte de confusão na nomenclatura de enzimas. Uma enzima pode ter sido descoberta com a utilização de um experimento no qual, por exemplo, A é convertido em B. A enzima é, então, chamada de acordo com essa reação. Trabalhos posteriores, entretanto, podem mostrar que, na célula, a enzima funciona principalmente convertendo B em A. Em geral, o primeiro nome continua a ser utilizado, embora a função metabólica da enzima fosse mais bem descrita nomeando-a pela reação inversa. A enzima glicolítica piruvato-cinase ilustra essa situação (p. 544). Para um principiante na bioquímica, essa duplicação da nomenclatura pode ser desorientadora. Comissões internacionais têm feito esforços heroicos para sistematizar a nomenclatura das enzimas (ver Tabela 6-3 para um breve resumo do sistema), porém alguns nomes sistemáticos são muito longos e complicados e não são utilizados no dia a dia bioquímico.

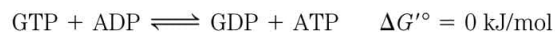
Ao longo deste livro, tentou-se utilizar os nomes enzimáticos mais comumente utilizados pelos bioquímicos e chamar a atenção para os casos nos quais uma enzima tem mais de um nome amplamente utilizado. Para informações atualizadas sobre a nomenclatura enzimática, recorra às recomendações da Comissão de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology; www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/nomenclature).

Essa reação que poupa energia envolve uma etapa intermediária, na qual a própria molécula da enzima é fosforilada em um resíduo de His no sítio ativo (**Figura 16-13a**). Esse grupo fosfato, que tem alto potencial de transferência de grupo, é transferido ao ADP (ou GDP) para a formação de ATP (ou GTP). As células animais têm duas isoenzimas da succinil-CoA-sintetase, uma específica para ADP e outra para GDP. A enzima contém duas subunidades, α (M_r 32.000), que tem o resíduo de (P)-His (His²⁴⁶) e o sítio de ligação para CoA, e β (M_r 42.000), que confere a especi-



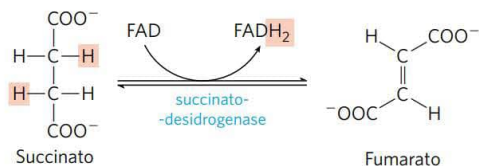
ficidade por ADP ou GDP. O sítio ativo situa-se na interface entre as subunidades. A estrutura cristalina da succinil-CoA-sintetase revela duas “hélices propulsoras” (uma em cada subunidade), orientadas de maneira que seus dipolos elétricos posicionem as cargas parciais positivas próximas ao resíduo (P)-His carregado negativamente (Figura 16-13b), estabilizando o intermediário fosfoenzima. (Lembre-se da função similar das hélices bipolares na estabilização dos íons K^+ no canal de K^+ ; ver Figura 11-45.)

A formação de ATP (ou GTP) à custa da energia liberada pela descarboxilação oxidativa do α -cetoglutarato é uma fosforilação no nível do substrato, como a síntese de ATP nas reações glicolíticas catalisadas por gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase e piruvato-cinase (ver Figura 14-2). O GTP formado pela succinil-CoA-sintetase pode doar o grupo fosfato terminal ao ADP para formar ATP, em uma reação reversível catalisada pela **nucleosídeo-difosfato-cinase** (p. 516):



Desse modo, o resultado líquido da atividade de cada isoenzima da succinil-CoA-sintetase é a conservação de energia como ATP. Não há variação de energia livre na reação da nucleosídeo-difosfato-cinase; ATP e GTP são energeticamente equivalentes.

6 Oxidação de succinato a fumarato O succinato formado a partir da succinil-CoA é oxidado a **fumarato** pela flavoproteína **succinato-desidrogenase**:

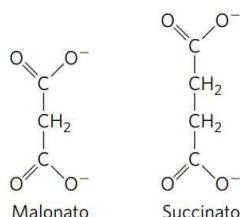


$$\Delta G'^{\circ} = 0 \text{ kJ/mol}$$

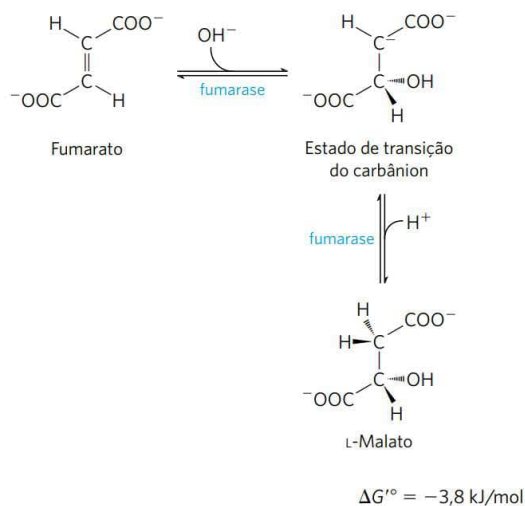
Em eucariotos, a succinato-desidrogenase está firmemente ligada à membrana mitocondrial interna; em bactérias, está ligada à membrana plasmática. A enzima contém três grupos ferro-enzofre diferentes e uma molécula de FAD covalentemente ligada (ver Figura 19-9). Os elétrons do succinato passam pelo FAD e pelos centros de ferro-enzofre antes de entrarem na cadeia de transporte de elétrons da membrana mitocondrial interna (da membrana plasmática).

FIGURA 16-13 A reação da succinil-CoA-sintetase. (a) Na etapa 1, a CoA da succinil-CoA ligada à enzima é substituída por um grupo fosfato, formando um acil-fosfato de alta energia. Na etapa 2, o succinil-fosfato doa o grupo fosfato para um resíduo de His da enzima, originando uma fosfo-histidil-enzima de alta energia. Na etapa 3, o grupo fosfato é transferido do resíduo de His ao fosfato terminal do GDP (ou ADP), formando GTP (ou ATP). Sítio ativo da succinil-CoA-sintetase de *E. coli*. O sítio ativo inclui parte de ambas as subunidades, α (em azul) e β (em marrom). As hélices carregadas (azul, marrom) posicionam as cargas parciais positivas do dipolo da hélice próximas ao grupo fosfato da (P)-His²⁴⁶ na cadeia α , estabilizando a enzima com a fosfo-histidina. As enzimas de mamíferos e bactérias apresentam sequências de aminoácidos e estruturas tridimensionais semelhantes. [Fonte: modificada de PDB ID 1SCU, W. T. Wolodko et al., *J. Biol. Chem.* 269:10.883, 1994.]

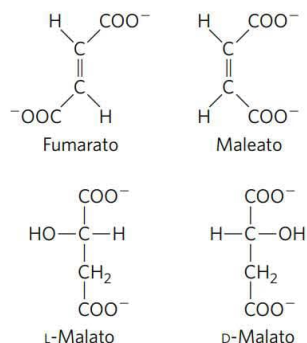
tica em bactérias). O fluxo dos elétrons do succinato ao longo desses transportadores até oceptor de elétrons final, O_2 , é acoplado à síntese de aproximadamente 1,5 molécula de ATP por par de elétrons (fosforilação acoplada à respiração). O malonato, um análogo do succinato normalmente ausente nas células, é um forte inibidor competitivo da succinato-desidrogenase, e, em laboratório, sua adição à mitocôndria bloqueia a atividade do ciclo do ácido cítrico.



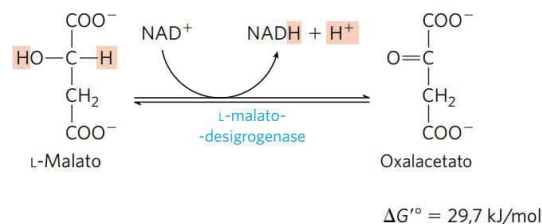
7 Hidratação de fumarato a malato A hidratação reversível do fumarato a L-malato é catalisada pela **fumarase** (anteriormente chamada de **fumarato-hidratase**). O estado de transição dessa reação é um carbânion:



Essa enzima é altamente estereoespecífica; ela catalisa a hidratação da ligação dupla *trans* do fumarato, mas não a da ligação dupla *cis* do maleato (o isômero *cis* do fumarato). Na direção inversa (de L-malato para fumarato), a fumarase é igualmente estereoespecífica: D-malato não é um substrato.



8 Oxidação de malato a oxalacetato Na última reação do ciclo do ácido cítrico, a **L-malato desidrogenase** catalisa a oxidação do L-malato a oxalacetato, acoplada à redução do NAD^+ a NADH :



O equilíbrio dessa reação é muito deslocado para a esquerda sob as condições termodinâmicas padrão, porém, nas células intactas, o oxalacetato é continuamente removido pela reação altamente exergônica da citrato-sintase (etapa 2 da Figura 16-7). Isso mantém a concentração celular de oxalacetato extremamente baixa ($< 10^{-6} \text{ M}$), deslocando a reação da malato-desidrogenase no sentido da formação de oxalacetato.

Embora as reações individuais do ciclo do ácido cítrico tenham sido inicialmente elucidadas *in vitro*, utilizando tecido muscular macerado, a via e sua regulação também têm sido intensamente estudadas *in vivo*. Com a utilização de precursores marcados radioativamente com ^{14}C , os pesquisadores têm delineado o destino de átomos de carbono individuais durante o ciclo do ácido cítrico. Alguns dos experimentos iniciais com ^{14}C , entretanto, produziram resultados inesperados, que originaram considerável controvérsia sobre a via e o mecanismo do ciclo do ácido cítrico. Na verdade, esses experimentos pareciam inicialmente mostrar que o citrato não era o primeiro ácido tricarbílico formado. O Quadro 16-3 conta alguns detalhes desse episódio da história da pesquisa do ciclo do ácido cítrico. O fluxo metabólico ao longo do ciclo agora pode ser monitorado em tecidos vivos com o uso de precursores marcados com ^{13}C e espectroscopia por RMN. Como o sinal de RMN é exclusivo do composto contendo ^{13}C , os bioquímicos podem determinar o movimento dos carbonos dos precursores em cada intermediário do ciclo e em compostos derivados desses intermediários. Essa técnica é bastante promissora para os estudos da regulação do ciclo do ácido cítrico e suas interconexões com outras vias metabólicas, como a glicólise.

A energia das oxidações do ciclo é conservada de maneira eficiente

Até aqui foi esmiuçada uma rodada completa do ciclo do ácido cítrico (Figura 16-14). Um grupo acetila com dois carbonos entra no ciclo, combinando-se com o oxalacetato. Dois átomos de carbono saem do ciclo na forma de CO_2 pela oxidação do isocitrato e do α -cetoglutarato. A energia liberada por estas oxidações foi conservada pela redução de três NAD^+ e um FAD e pela produção de um ATP ou GTP . No final do ciclo, uma molécula de oxalacetato foi regenerada. Lembre-se de que os dois átomos de carbono que emergem como CO_2 não são os mesmos dois carbonos que entraram na forma de grupo acetila; rodadas adicionais são necessárias para que estes carbonos sejam liberados na forma de CO_2 (Figura 16-7).

QUADRO 16-3 Citrato: uma molécula simétrica que reage assimetricamente

Quando os compostos enriquecidos no isótopo de carbono pesado ^{13}C e nos isótopos radioativos de carbono ^{11}C e ^{14}C se tornaram disponíveis cerca de 60 anos atrás, eles foram imediatamente utilizados para definir o rumo dos átomos de carbono durante o ciclo do ácido cítrico. Um desses experimentos desencadeou a controvérsia sobre a função do citrato. O acetato marcado no grupo carboxila (designado $[1-^{14}\text{C}]$ acetato) foi incubado sob condições aeróbicas com uma preparação de tecido animal. O acetato é convertido enzimaticamente em acetil-CoA nos tecidos animais, e a via do carbono da carboxila marcado radioativamente até o grupo acetila nas reações do ciclo pode, então, ser determinada. Após a incubação, o α -cetoglutarato foi isolado do tecido, e, depois, degradado por reações químicas conhecidas para estabelecer a(s) posição(ões) do isótopo de carbono.

Esperava-se que a condensação de oxalacetato não marcado com acetato marcado na carboxila produzisse citrato marcado em um dos dois grupos carboxila primários. O citrato é uma molécula simétrica, seus dois grupos carboxila terminais são indistinguíveis. Consequentemente, era esperado que metade das moléculas de citrato marcadas originasse α -cetoglutarato marcado na carboxila α e que a outra metade originasse α -cetoglutarato marcado na carboxila γ : isto é, esperava-

-se que o α -cetoglutarato isolado fosse uma mistura dos dois tipos de moléculas marcadas (Figura Q-1, vias 1 e 2). Contrariando essas expectativas, o α -cetoglutarato marcado isolado da suspensão de tecido continha ^{14}C somente na carboxila γ (Figura Q-1, via 1). Os investigadores concluíram que o citrato (ou qualquer outra molécula simétrica) não poderia ser um intermediário da via entre acetato e α -cetoglutarato. Em vez disso, um ácido tricarbóxico assimétrico, presumivelmente *cis*-aconitato ou isocitrato, deveria ser o primeiro produto formado pela condensação de acetato e oxalacetato.

Em 1948, entretanto, Alexandre Ogston mostrou que, embora o citrato não tenha centro quiral (ver Figura 1-21), ele tem *potencial* para reagir assimetricamente se a enzima com a qual ele interage possuir um sítio ativo assimétrico. Ele sugeriu que o sítio ativo da aconitase tinha três pontos, aos quais o citrato deveria estar ligado, e que o citrato deveria se posicionar de maneira a se unir especificamente a esses três pontos. Como visto na Figura Q-2, a ligação do citrato aos três pontos poderia ocorrer de uma maneira apenas, e isso acarretaria na formação de um único tipo de α -cetoglutarato marcado. Moléculas orgânicas como o citrato, sem centro quiral, mas potencialmente capazes de reagirem assimetricamente com um sítio ativo assimétrico, são atualmente chamadas de **moléculas pró-quirais**.

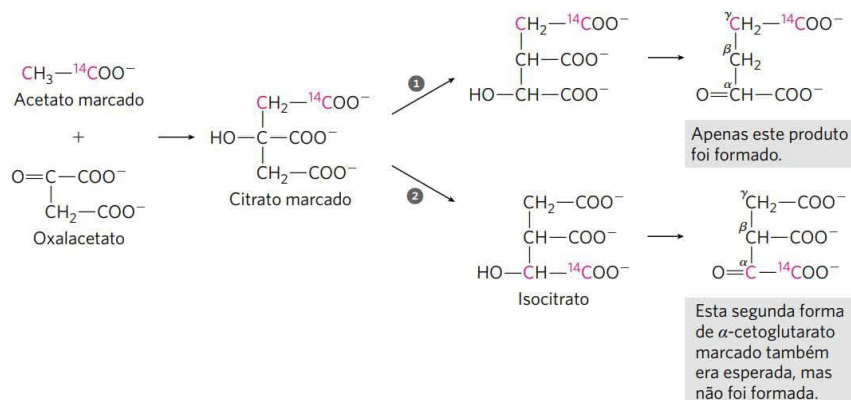


FIGURA Q-1 Incorporação do carbono isotópico (^{14}C) do grupo acetila marcado ao α -cetoglutarato durante o ciclo do ácido cítrico. Os átomos de carbono do grupo acetila que entra no ciclo estão representados em vermelho.

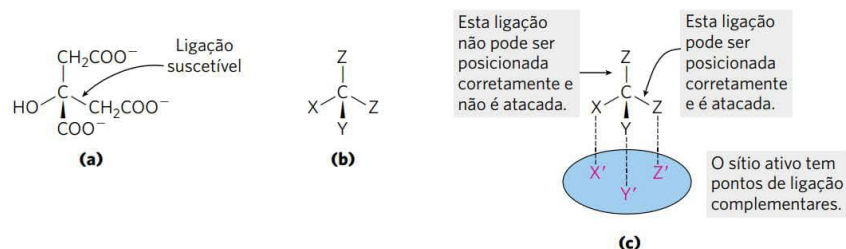


FIGURA Q-2 A natureza pró-quiral do citrato. **(a)** Estrutura do citrato; **(b)** representação esquemática do citrato: X = $-\text{OH}$; Y = $-\text{COO}^-$; Z = $-\text{CH}_2\text{COO}^-$. **(c)** Encaixe complementar correto do citrato ao sítio de ligação da aconitase. Existe apenas uma maneira na qual os três grupos especificados do citrato podem se encaixar aos três pontos do sítio de ligação. Portanto, apenas um dos dois grupos $-\text{CH}_2\text{COO}^-$ liga-se à aconitase.

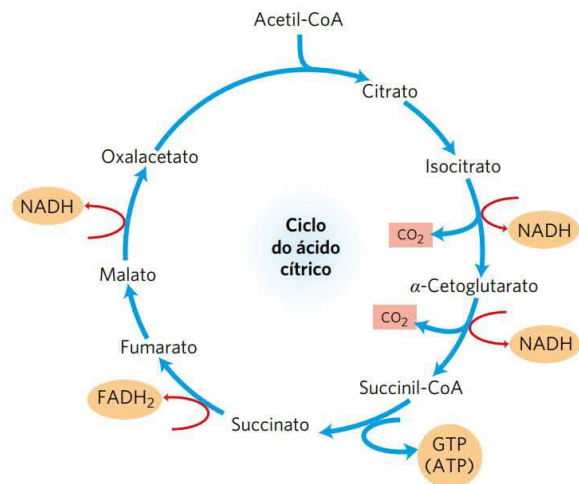


FIGURA 16-14 **Produtos de uma rodada do ciclo do ácido cítrico**
A cada rodada do ciclo do ácido cítrico, três moléculas de NADH, uma de FADH₂, uma de GTP (ou ATP) e duas de CO₂ são liberadas em reações de descarboxilação oxidativa. Aqui, e em algumas das figuras seguintes, todas as reações do ciclo estão representadas como se elas ocorressem em apenas um sentido; lembre-se, entretanto, de que a maioria das reações é reversível (ver Figura 16-7).

Embora o ciclo do ácido cítrico gere diretamente somente um ATP por rodada (na conversão de succinil-CoA a succinato), as quatro etapas de oxidação do ciclo abastecem a cadeia respiratória, via NADH e FADH₂, com um grande fluxo de elétrons e, assim, levam à formação de um grande número de moléculas de ATP durante a fosforilação oxidativa.

Foi visto, no Capítulo 14, que o rendimento energético da produção de duas moléculas de piruvato a partir de uma molécula de glicose é de 2 ATP e 2 NADH. Na fosforilação oxidativa (Capítulo 19), a passagem de dois elétrons do NADH ao O₂ impele a formação de aproximadamente 2,5 ATP, e a passagem de dois elétrons do FADH₂ ao O₂ rende cerca de 1,5 ATP. Essa estequiometria nos permite calcular o rendimento global em ATP da oxidação completa da glicose. Quando ambas as moléculas de piruvato são oxidadas a 6 CO₂ via complexo da piruvato-desidrogenase e ciclo do ácido cítrico e os elétrons são transferidos ao O₂ via energia da fosforilação oxidativa, até 32 ATPs são obtidos por molécula de glicose (Tabela 16-1). Em números redondos, isso representa a conservação de 32 × 30,5 kJ/mol = 976 kJ/mol, ou 34% do máximo teórico de cerca de 2.840 kJ/mol produzidos pela oxidação completa da glicose. Esses cálculos utilizam as variações de energia livre padrão; quando corrigidos para a energia livre de fato requerida para a formação de ATP dentro das células (ver Problema 13-2, p. 509), a eficiência calculada do processo aproxima-se de 65%.

Por que a oxidação do acetato é tão complicada?

Um processo cíclico em oito etapas para a oxidação de simples grupos acetila de dois carbonos a CO₂ pode parecer desnecessariamente complicado e em discordância com o princípio biológico de economia máxima. A função do ciclo do ácido cítrico, entretanto, não se restringe à oxidação do acetato. Essa via é o pivô do metabolismo intermediário. Produtos finais com quatro e cinco carbonos originários de muitos processos catabólicos são utilizados para alimentar o ciclo e servirem como combustíveis. Oxalacetato e α-cetoglutarato, por exemplo, são produzidos a partir de as-

TABELA 16-1 **Estequiometria da redução de coenzimas e formação de ATP na oxidação aeróbica da glicose via glicólise, reação do complexo da piruvato-desidrogenase, ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa**

Reação	Número de ATP ou coenzimas reduzidas diretamente formados	Quantidade de ATP formado no final ^a
Glicose → glicose-6-fosfato	– 1 ATP	–1
Frutose-6-fosfato → frutose-1,6-bisfosfato	– 1 ATP	–1
2 Gliceraldeído-3-fosfato → 2 1,3-bisfosfoglicerato	2 NADH	3 ou 5 ^b
2 1,3-Bisfosfoglicerato → 2 3-fosfoglicerato	2 ATP	2
2 Fosfoenolpiruvato → 2 piruvato	2 ATP	2
2 Piruvato → 2 acetil-CoA	2 NADH	5
2 Isocitrato → 2 α-cetoglutarato	2 NADH	5
2 α-Cetoglutarato → 2 succinil-CoA	2 NADH	5
2 Succinil-CoA → 2 succinato	2 ATP (ou 2 GTP)	2
2 Succinato → 2 fumarato	2 FADH ₂	3
2 Malato → 2 oxalacetato	2 NADH	5
Total		30-32

^aCalculado como 2,5 ATP por NADH e 1,5 ATP por FADH₂. Um valor negativo indica consumo.
^bO número formado é 3 ou 5, dependendo do mecanismo utilizado para a transferência de equivalentes de NADH do citosol para a matriz mitocondrial; ver Figuras 19-30 e 19-31.

partato e glutamato, respectivamente, quando proteínas são degradadas. Sob determinadas circunstâncias metabólicas, intermediários são drenados do ciclo para serem utilizados como precursores em diferentes vias biossintéticas.

O ciclo do ácido cítrico, como todas as outras vias metabólicas, é um produto da evolução, e boa parte dessa evolução ocorreu antes do surgimento dos organismos aeróbicos. Ele não necessariamente representa a via *mais curta* entre acetato e CO_2 , mas é a via que, ao longo do tempo, tem conferido a maior vantagem seletiva. Anaeróbios primitivos muito provavelmente utilizavam algumas das reações do ciclo do ácido cítrico em processos biossintéticos lineares. Na verdade, alguns microrganismos anaeróbicos atuais utilizam um ciclo do ácido cítrico incompleto, não como fonte de energia, mas como precursores biossintéticos (**Figura 16-15**). Esses organismos utilizam as três primeiras reações do ciclo para sintetizarem α -cetoglutarato, porém, como carecem de α -cetoglutarato-desidrogenase, não podem realizar o conjunto completo das reações do ciclo do ácido cítrico. O que esses organismos, de fato, possuem são as quatro enzimas que catalisam a conversão reversível de oxalacetato a succinil-CoA e podem produzir malato, fumarato, succinato e succinil-CoA a partir de oxalacetato, em uma inversão do sentido “normal” (oxidativo) do fluxo do ciclo. Essa via é uma fermentação, e o NADH produzido pela oxidação do isocitrato é reciclado a NAD^+ pela redução do oxalacetato a succinato.

Com a evolução das cianobactérias, que produzem O_2 a partir de água, a atmosfera da Terra tornou-se rica em oxi-

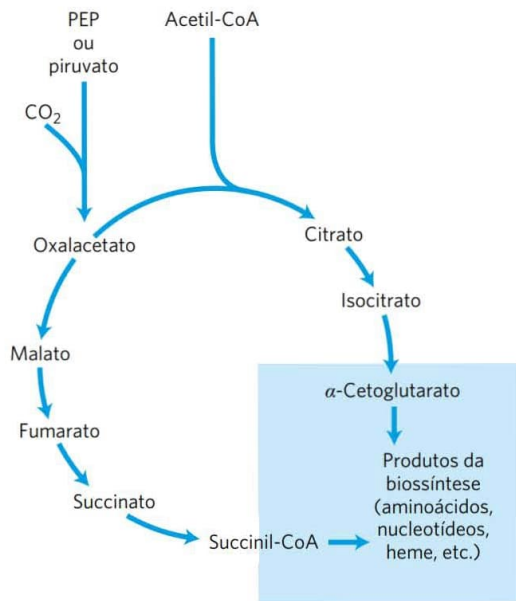


FIGURA 16-15 Precursor biossintético produzido por um ciclo do ácido cítrico incompleto em bactérias anaeróbicas. Esses organismos anaeróbicos não têm α -cetoglutarato-desidrogenase e, portanto, não podem realizar o ciclo do ácido cítrico completo. O α -cetoglutarato e a succinil-CoA servem como precursores em uma variedade de vias biossintéticas. (Ver Figura 16-14 para o sentido “normal” destas reações no ciclo do ácido cítrico.)

gênio e os organismos sofreram uma pressão seletiva para o desenvolvimento do metabolismo aeróbico, o qual é muito mais eficiente do que a fermentação anaeróbica.

Os componentes do ciclo do ácido cítrico são importantes intermediários biossintéticos

Em organismos aeróbicos, o ciclo do ácido cítrico é uma **via anfibólica**, ou seja, que serve a processos catabólicos e anabólicos. Além do papel no catabolismo oxidativo de carboidratos, ácidos graxos e aminoácidos, o ciclo fornece precursores para muitas vias de biossíntese (**Figura 16-16**), por meio das reações que serviram a esse mesmo propósito em ancestrais anaeróbicos. α -Cetoglutarato e oxalacetato podem, por exemplo, ser os precursores dos aminoácidos aspartato e glutamato por simples transaminação (Capítulo 22). Por meio do aspartato e do glutamato, os carbonos do oxalacetato e do α -cetoglutarato são, então, utilizados para a síntese de outros aminoácidos, assim como para a síntese de nucleotídeos púricos e pirimídicos. A succinil-CoA é um intermediário central para a síntese do anel porfirínico dos grupos heme, que agem como transportadores de oxigênio (na hemoglobina e na mioglobina) e transportadores de elétrons (nos citocromos) (ver Figura 22-25). O oxalacetato pode ser convertido em glicose na gliconeogênese (ver Figura 15-13).

Como os átomos de carbono das moléculas de acetato que entram no ciclo do ácido cítrico aparecem oito etapas depois no oxalacetato, pode parecer que esta via pode produzir oxalacetato a partir de acetato e, assim, originar fosfoenolpiruvato para a gliconeogênese. Contudo, como mostrado por um exame da estequiometria do ciclo do ácido cítrico, não há conversão líquida de acetato em oxalacetato; para cada dois carbonos que entram no ciclo na forma de acetil-CoA, dois são liberados na forma de CO_2 . Em muitos organismos que não os vertebrados e em todas as plantas vasculares, o **ciclo do glioxilato** funciona como mecanismo para a conversão de acetato a carboidratos. O ciclo do glioxilato converte *duas* moléculas de acetato a uma de oxalacetato em uma variante do ciclo do ácido cítrico, na qual os dois passos de descarboxilação são contornados (ver Figura 20-55). Assim, as plantas e muitos organismos mais simples podem sintetizar glicose a partir de ácidos graxos; os vertebrados, contudo, não podem fazê-lo.

Reações anapleróticas repõem os intermediários do ciclo do ácido cítrico

Conforme os intermediários do ciclo do ácido cítrico são removidos para servirem como precursores na biossíntese, eles são repostos por **reações anapleróticas** (Figura 16-16; Tabela 16-2). Sob circunstâncias normais, há um equilíbrio dinâmico entre reações que desviam os intermediários a outras vias e reações que os repõem, de modo que as concentrações dos intermediários do ciclo do ácido cítrico permaneçam quase constantes.

A Tabela 16-2 mostra as reações anapleróticas mais comuns, as quais, em vários tecidos e organismos, convertem ou piruvato ou fosfoenolpiruvato em oxalacetato ou malato. A reação anaplerótica mais importante no fígado e nos

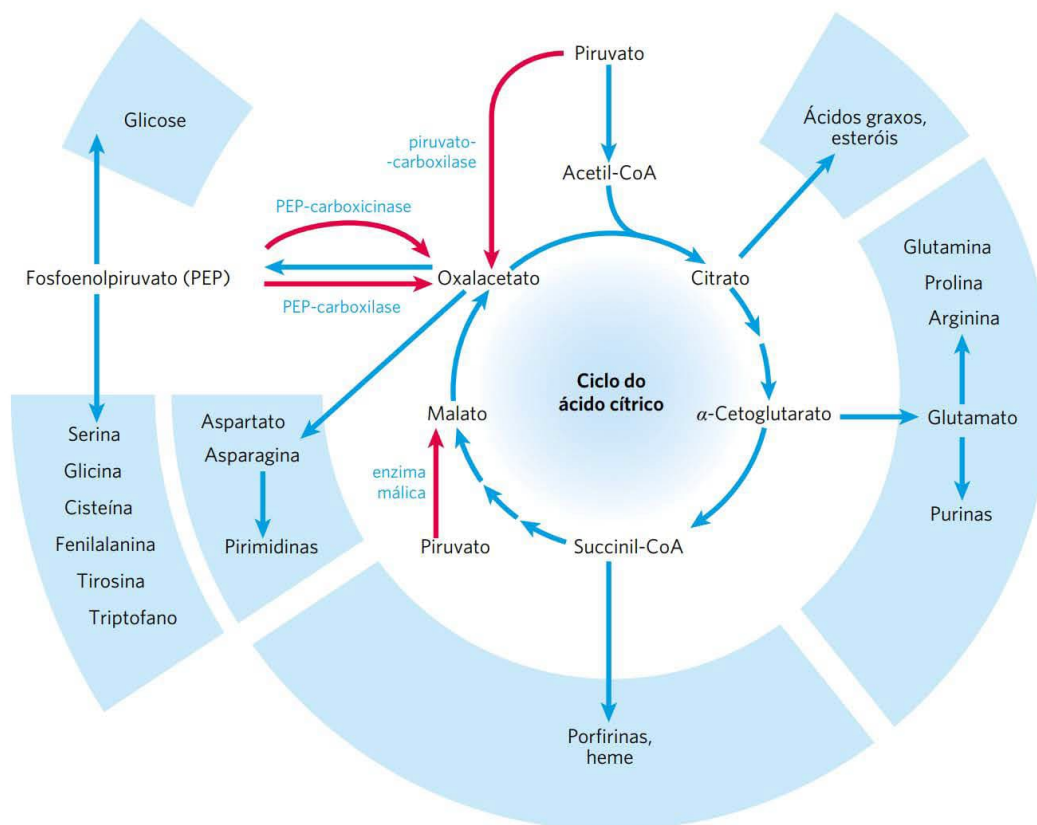


FIGURA 16-16 Papel do ciclo do ácido cítrico no anabolismo. Intermediários do ciclo do ácido cítrico são desviados como precursores de muitas vias biossintéticas. Em vermelho aparecem quatro reações anapleróticas que repõem os intermediários do ciclo que foram esgotados (ver Tabela 16-2).

rins de mamíferos é a carboxilação reversível do piruvato pelo CO_2 para a formação de oxalacetato, catalisada pela **piruvato-carboxilase**. Quando o ciclo do ácido cítrico está deficiente em oxalacetato ou qualquer outro intermediário, o piruvato é carboxilado para produzir mais oxalacetato. A adição enzimática de um grupo carboxila ao piruvato requer energia, que é suprida pelo ATP – a energia livre necessária para unir um grupo carboxila ao piruvato é aproximadamente igual à energia livre disponibilizada pelo ATP.

A piruvato-carboxilase é uma enzima reguladora essencialmente inativa na ausência de acetil-CoA, seu modulador alostérico positivo. Sempre que a acetil-CoA, o combustível

do ciclo do ácido cítrico, está presente em excesso, ela estimula a reação da piruvato-carboxilase para a produção de mais oxalacetato, permitindo que o ciclo utilize mais acetil-CoA na reação da citrato-sintase.

As outras reações anapleróticas mostradas na Tabela 16-2 também são reguladas de modo a manter o nível dos intermediários suficientemente alto para sustentar a atividade do ciclo do ácido cítrico. A fosfoenolpiruvato (PEP)-carboxilase, por exemplo, é ativada pelo intermediário glicolítico frutose-1,6-bisfosfato, que se acumula quando o ciclo do ácido cítrico processa muito lentamente o piruvato gerado pela glicólise.

TABELA 16-2 Reações anapleróticas

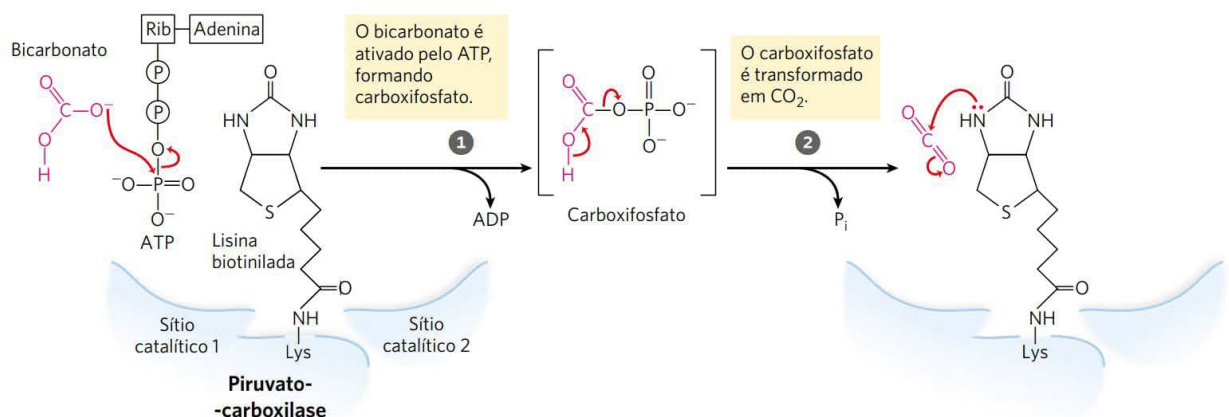
Reação	Tecido(s)/organismo(s)
$\text{Piruvato} + \text{HCO}_3^- + \text{ATP} \xrightleftharpoons{\text{piruvato-carboxilase}} \text{oxalacetato} + \text{ADP} + \text{P}_i$	Fígado, rins
$\text{Fosfoenolpiruvato} + \text{CO}_2 + \text{GDP} \xrightleftharpoons{\text{PEP-carboxicinase}} \text{oxalacetato} + \text{GTP}$	Coração, músculo esquelético
$\text{Fosfoenolpiruvato} + \text{HCO}_3^- \xrightleftharpoons{\text{PEP-carboxilase}} \text{oxalacetato} + \text{P}_i$	Vegetais superiores, leveduras, bactérias
$\text{Piruvato} + \text{HCO}_3^- + \text{NAD(P)H} \xrightleftharpoons{\text{enzima málica}} \text{malato} + \text{NAD(P)}^+$	Amplamente distribuída em eucariotos e bactérias

A biotina da piruvato-carboxilase transporta grupos CO_2

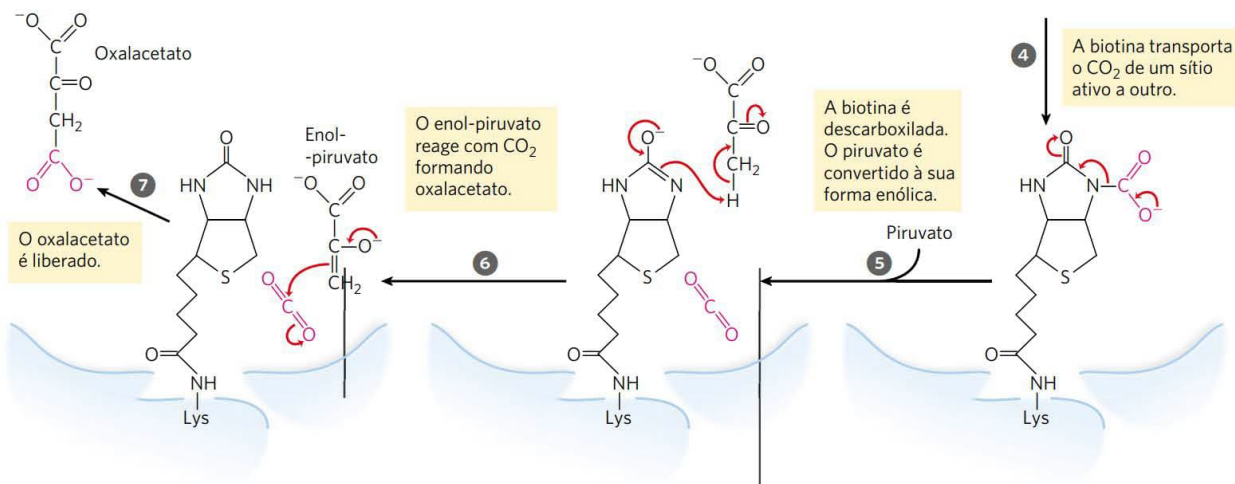
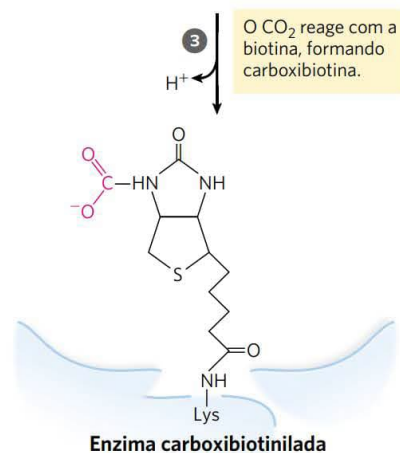
A reação da piruvato-carboxilase requer a vitamina **biotina** (Figura 16-17), que é o grupo prostético da enzima. A biotina tem uma função-chave em muitas reações de carboxilação. Ela é um transportador especializado dos grupos de um carbono em sua forma mais oxidada: CO_2 . (A transferência de grupos de um carbono em formas mais reduzidas é mediada por outros cofatores, particularmente tetra-hidrofo-

lato e *S*-adenosilmetionina, como descrito no Capítulo 18.) Os grupos carboxila são ativados em uma reação que une o CO_2 à biotina ligada à enzima com consumo de ATP. Esse CO_2 “ativado” passa a um aceptor (nesse caso, piruvato) em uma reação de carboxilação.

A piruvato-carboxilase tem quatro subunidades idênticas, cada uma contendo uma molécula de biotina ligada covalentemente por uma ligação amida com o grupo ϵ -amino de um resíduo de Lys específico presente no sítio ativo da



MECANISMO-FIGURA 16-17 O papel da biotina na reação catalisada pela piruvato-carboxilase. A biotina está ligada à enzima por uma ligação amida com o grupo ϵ -amino de um resíduo de Lys, formando a enzima biotilada. A reação de carboxilação mediada pela biotina ocorre em duas fases, geralmente catalisadas em sítios ativos separados da enzima, como exemplificado pela reação da piruvato-carboxilase. Na primeira fase (etapas 1 a 3), o bicarbonato é convertido em CO_2 , mais ativo, sendo então utilizado para carboxilar a biotina. A biotina atua como um transportador, carregando o CO_2 de um sítio ativo ao outro, localizado em um monômero adjacente da enzima tetramérica (etapa 4). Na segunda fase (etapas 5 a 7), catalisada neste segundo sítio ativo, o CO_2 reage com o piruvato para formar oxalacetato.



enzima. A carboxilação do piruvato ocorre em duas etapas (Figura 16-17): primeiro, um grupo carboxila derivado do HCO_3^- é ligado à biotina, sendo, então, transferido ao piruvato para formar oxalacetato. Essas duas etapas ocorrem em sítios ativos separados; o braço longo e flexível da biotina transfere os grupos carboxila ativados do primeiro sítio ativo (em um dos monômeros do tetrâmero) ao segundo (no monômero adjacente), funcionando muito semelhantemente ao braço longo de lipoil-lisina de E_2 no complexo da PDH (Figura 16-6) e ao braço longo da porção semelhante à CoA da proteína transportadora de acilas envolvida na síntese de ácidos graxos (ver Figura 21-5); essas moléculas são comparadas na **Figura 16-18**. O lipoato, a biotina e o pantotenato entram nas células por meio do mesmo transportador, todos se tornam ligados covalentemente a proteínas por reações semelhantes, e todos originam um conector flexível que possibilita que os intermediários da reação se movam de um sítio ativo a outro em um complexo enzimático sem se dissociarem do complexo – isto é, todos participam da canalização do substrato.

A biotina é uma vitamina essencial da dieta humana; ela é abundante em muitos alimentos e é sintetizada por bactérias intestinais. A deficiência de biotina é rara, mas pode algumas vezes ser causada por uma dieta rica em ovos crus. A clara do ovo contém grande quantidade da proteína **avidina** (M_r 70.000), que se liga com muita afinidade à biotina e impede sua absorção no intestino. A avidina do ovo pode ser um mecanismo de defesa para o potencial embrião da ave, inibindo o crescimento de bactérias. Quando os ovos são cozidos, a avidina é desnaturada (e, portanto, inativada), juntamente com todas as outras proteínas da

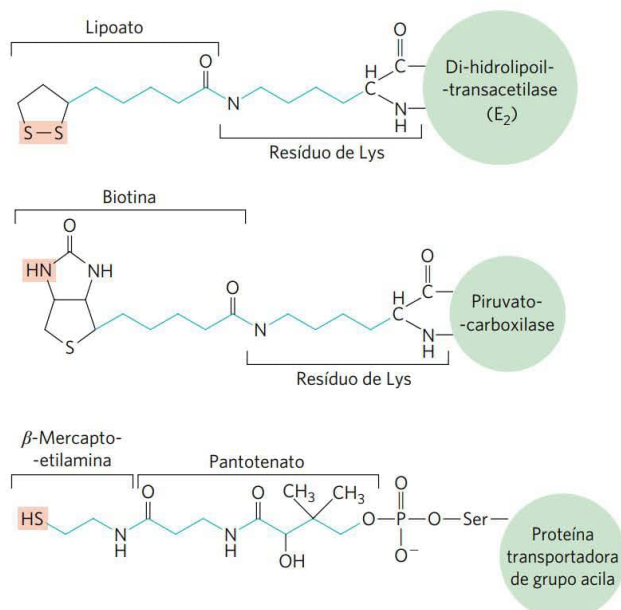


FIGURA 16-18 Conectores biológicos. Os cofatores lipoato, biotina e a combinação de β -mercaptopetilamina e pantotenato formam longos braços flexíveis (em azul) nas enzimas às quais estão ligados covalentemente, atuando como conectores que movem os intermediários de um sítio ativo ao outro. O grupo sombreado em vermelho é, em cada caso, o ponto de ligação do intermediário ativado ao conector.

clara do ovo. A avidina purificada é um reagente muito útil na bioquímica e na biologia celular. Uma proteína ligada covalentemente à biotina (obtida experimentalmente ou produzida *in vivo*) pode ser purificada por cromatografia de afinidade (ver Figura 3-17c) com base na forte afinidade da biotina pela avidina. A proteína é, então, eluída da coluna com excesso de biotina livre. A afinidade muito alta da biotina pela avidina também é utilizada em laboratório para unir duas estruturas, agindo como cola molecular (ver Figura 19-27).

RESUMO 16.2 Reações do ciclo do ácido cítrico

- O ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs, ciclo do ácido tricarboxílico) é uma via catabólica central e praticamente universal por meio da qual os compostos derivados da degradação de carboidratos, gorduras e proteínas são oxidados a CO_2 , com a maior parte da energia da oxidação temporariamente armazenada nos transportadores de elétrons FADH_2 e NADH . Durante o metabolismo aeróbico, esses elétrons são transferidos ao O_2 , e a energia do fluxo de elétrons é capturada na forma de ATP.
- A acetil-CoA entra no ciclo do ácido cítrico (na mitocôndria de eucariotos, no citosol de bactérias) quando a citrato-sintase catalisa sua condensação com o oxalacetato para a formação de citrato.
- Em sete reações sequenciais, incluindo duas descarboxilações, o ciclo do ácido cítrico converte citrato em oxalacetato e libera dois CO_2 . A via é cíclica, de modo que os intermediários não são esgotados; para cada oxalacetato consumido na via, um é produzido.
- Para cada acetil-CoA oxidada pelo ciclo do ácido cítrico, o ganho de energia consiste em três moléculas de NADH , uma de FADH_2 e um nucleosídeo trifosfatado (ATP ou GTP).
- Além da acetil-CoA, qualquer composto que origine um intermediário do ciclo do ácido cítrico com quatro ou cinco carbonos – por exemplo, os produtos da degradação de muitos aminoácidos – pode ser oxidado pelo ciclo.
- O ciclo do ácido cítrico é anfibólico, servindo ao catabolismo e ao anabolismo; os intermediários do ciclo podem ser desviados e utilizados como material de partida para a síntese de diversos produtos.
- Os vertebrados não conseguem sintetizar glicose a partir do acetato ou dos ácidos graxos que dão origem à acetil-CoA.
- Quando os intermediários são desviados do ciclo do ácido cítrico para outras vias, eles são repostos por algumas reações anapleróticas, que produzem intermediários de quatro carbonos por meio da carboxilação de compostos de três carbonos; essas reações são catalisadas por piruvato-carboxilase, PEP-carboxicinas, PEP-carboxilase e enzima málica.
- As enzimas que catalisam carboxilações utilizam comumente a biotina para ativar o CO_2 e transportá-lo a aceptores, como piruvato ou fosfoenolpiruvato.

16.3 Regulação do ciclo do ácido cítrico

Como foi analisado no Capítulo 15, a regulação de enzimas-chave em vias metabólicas, por meio de efetores alostéricos e modificações covalentes, garante a produção dos intermediários nas taxas necessárias para manter a célula em um estado de equilíbrio estável enquanto evita o desperdício de uma superprodução. O fluxo de átomos de carbono que entram no ciclo do ácido cítrico a partir do piruvato, e também durante o curso do ciclo, está sob constante regulação em pelo menos três níveis: o transporte de piruvato para a mitocôndria pelo transportador mitocondrial de piruvato (MPC); a conversão de piruvato em acetil-CoA, o material de partida do ciclo (a reação do complexo da piruvato-desidrogenase); e a entrada da acetil-CoA no ciclo (a reação da citrato-sintase). A acetil-CoA também é produzida por outras vias que não a reação do complexo da PDH – a maioria das células produz acetil-CoA pela oxidação de ácidos graxos e certos aminoácidos – e a disponibilidade de intermediários a partir dessas outras vias é importante na regulação da oxidação do piruvato e do ciclo do ácido cítrico. O ciclo também é regulado nas reações da isocitrato-desidrogenase e da α -cetoglutarato-desidrogenase.

A produção de acetil-CoA pelo complexo da piruvato-desidrogenase é regulada por mecanismos alostéricos e covalentes

O complexo da PDH de mamíferos é inibido fortemente por ATP e também por acetil-CoA e NADH, os produtos da reação catalisada pelo complexo (**Figura 16-19**). A inibição alostérica da oxidação do piruvato é muito aumentada quando ácidos graxos de cadeia longa estão disponíveis. AMP, CoA e NAD^+ acumulam-se quando muito pouco acetato flui para o ciclo, ativando alostericamente o complexo da PDH. Portanto, essa enzima é desativada quando o combustível está disponível em grande quantidade, na forma de ácidos graxos e acetil-CoA, e quando as razões celulares $[\text{ATP}]/[\text{ADP}]$ e $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+]$ estão elevadas, e a enzima é ativada novamente quando a demanda de energia está alta e a célula necessita de um maior fluxo de acetil-CoA para o ciclo do ácido cítrico.

Em mamíferos, esses mecanismos de regulação alostéricos são complementados por um segundo nível de regulação: a modificação covalente de proteínas. O complexo da PDH é inibido pela fosforilação reversível de um resíduo de Ser específico em uma das duas subunidades E_1 . Como mencionado anteriormente, além das enzimas E_1 , E_2 e E_3 , o comple-

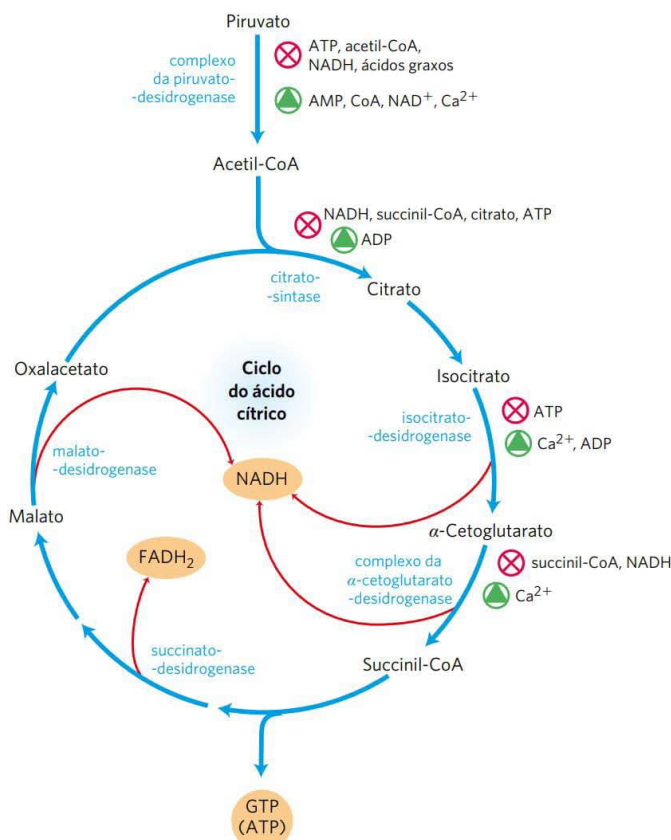
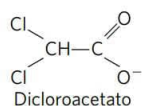


FIGURA 16-19 Regulação do fluxo dos metabólitos a partir do complexo da PDH durante o ciclo do ácido cítrico em mamíferos. O complexo da PDH é inibido alostericamente quando as razões $[\text{ATP}]/[\text{ADP}]$, $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+]$ e $[\text{acetil-CoA}]/[\text{CoA}]$ estão elevadas, indicando um estado metabólico com energia suficiente. Quando essas razões decrescem, o resultado é a ativação alostérica da oxidação do piruvato. A velocidade do fluxo pelo ciclo do ácido cítrico pode ser limitada pela disponibilidade dos substratos da citrato-sintase, do oxalacetato e da acetil-CoA, ou de NAD^+ , o qual é exaurido pela conversão a NADH, retardando as três etapas de oxidação dependentes de NAD^+ . A inibição por retroalimentação por succinil-CoA, citrato e ATP também diminui a velocidade do ciclo pela inibição de etapas iniciais. No tecido muscular, o Ca^{2+} estimula a contração e, como mostrado aqui, estimula o metabolismo gerador de energia para repor o ATP consumido durante a contração.

xo da PDH de mamíferos contém duas proteínas cujo único propósito é regular a atividade do complexo. A piruvato-desidrogenase-cinase fosforila e, dessa maneira, inativa E_1 , ao passo que uma fosfoproteína-fosfatase específica remove o grupo fosfato por hidrólise e, dessa forma, ativa E_1 . A cinase é alostericamente ativada por ATP: quando a [ATP] está elevada (refletindo um suprimento de energia adequado), o complexo da PDH é inativado pela fosforilação de E_1 . Quando a [ATP] diminui, a atividade da cinase diminui e a ação da fosfatase remove o grupo fosfato de E_1 , ativando o complexo.

Em laboratório, o composto simples dicloroacetato inibe a piruvato-desidrogenase-cinase e, assim, alivia a inibição do complexo da piruvato-desidrogenase. Isso estimula a oxidação do piruvato via ciclo do ácido cítrico e, assim, pode ter utilidade para direcionar o metabolismo em células tumorais, desviando-o da glicólise anaeróbica.



O ciclo do ácido cítrico é regulado em suas três etapas exergônicas

O fluxo de metabólitos durante o curso do ciclo do ácido cítrico é mantido sob regulação rigorosa. Três fatores controlam a velocidade do fluxo no ciclo: disponibilidade de substrato, inibição pelos produtos acumulados e inibição alostérica por retroalimentação das enzimas que catalisam as etapas iniciais do ciclo.

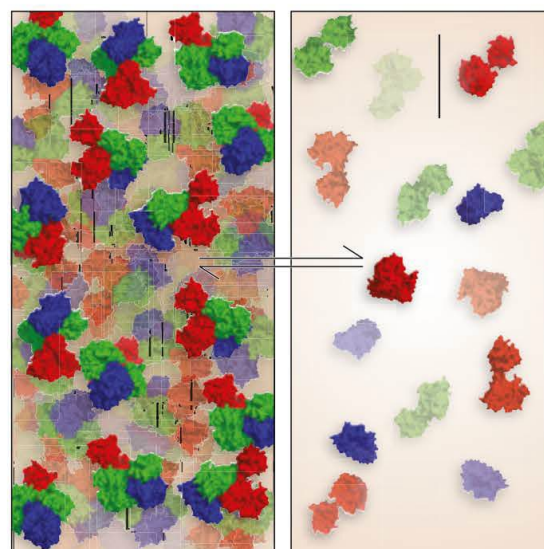
Cada uma das três etapas fortemente exergônicas do ciclo – aquelas catalisadas por citrato-sintase, isocitrato-desidrogenase e α -cetoglutarato-desidrogenase (Figura 16-19) – podem tornar-se a etapa limitante da velocidade sob algumas circunstâncias. A disponibilidade dos substratos da citrato-sintase (acetil-CoA e oxalacetato) varia com o estado metabólico da célula e, às vezes, limita a taxa de formação de citrato. O NADH, produto da oxidação do isocitrato e do α -cetoglutarato, acumula-se sob determinadas condições, e, quando a razão $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+]$ estiver alta, ambas as reações de desidrogenação são fortemente inibidas pela ação das massas. Na célula, de maneira semelhante, a reação da malato-desidrogenase está essencialmente em equilíbrio (i.e., é limitada pelo substrato), e quando a razão $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+]$ está alta, a concentração de oxalacetato está baixa, desacelerando a primeira etapa do ciclo. O acúmulo de produto inibe as três etapas limitantes do ciclo: a succinil-CoA inibe a α -cetoglutarato-desidrogenase (e também a citrato-sintase); o citrato bloqueia a citrato-sintase; e o produto final, ATP, inibe a citrato-sintase e a isocitrato-desidrogenase. A inibição da citrato-sintase pelo ATP é abrandada por ADP, um ativador alostérico dessa enzima. Nos músculos dos vertebrados, Ca^{2+} , o sinalizador para a contração e para o aumento concomitante na demanda de ATP, ativa a isocitrato-desidrogenase e a α -cetoglutarato-desidrogenase, assim como ativa o complexo da PDH. Dessa forma, as concentrações dos substratos e dos intermediários do ciclo do ácido cítrico ajustam o fluxo dessa via para a velocidade que forneça as concentrações ótimas de ATP e NADH.

Sob condições normais, as velocidades da glicólise e do ciclo do ácido cítrico estão integradas, de modo que a quan-

tidade de glicose metabolizada a piruvato seja exatamente a quantidade suficiente para suprir o ciclo do ácido cítrico com o seu combustível, os grupos acetila da acetil-CoA. Piruvato, lactato e acetil-CoA normalmente são mantidos nas concentrações do estado estacionário. A velocidade da glicólise é vinculada à velocidade do ciclo do ácido cítrico não apenas por meio da inibição pelos altos níveis de ATP e NADH, os quais são comuns a ambos os estágios da oxidação da glicose, a via glicolítica e a respiração, mas também é regulada pela concentração de citrato. Citrato, o produto da primeira reação do ciclo do ácido cítrico, é um importante inibidor alostérico da fosfofrutocinase 1 na via glicolítica (ver Figura 15-16).

A canalização do substrato em complexos multienzimáticos pode ocorrer durante o ciclo do ácido cítrico

Embora as enzimas do ciclo do ácido cítrico sejam normalmente descritas como componentes solúveis da matriz mitocondrial (exceto pela succinato-desidrogenase, que é ligada à membrana), evidências crescentes sugerem que, dentro da mitocôndria, essas enzimas existem como complexos multienzimáticos. A abordagem clássica da enzimologia – a purificação de proteínas isoladas a partir de extratos de células lisadas – foi utilizada com grande sucesso para as enzimas do ciclo do ácido cítrico. Entretanto, a primeira “vítima” da lise celular é o alto nível de organização da célula – as interações não covalentes e reversíveis de uma proteína com a outra, ou entre enzimas e algum componente estrutural, como membranas, microtúbulos ou microfilamentos. Quando as células são rompidas, seus conteúdos, incluindo enzimas, são diluídos 100 ou 1.000 vezes (Figura 16-20).



No citosol, altas concentrações das enzimas 1, 2 e 3 favorecem sua associação.

Em um extrato de células lisadas, a diluição com solução tampão reduz as concentrações das enzimas 1, 2 e 3, favorecendo sua dissociação.

FIGURA 16-20 A diluição de uma solução contendo um complexo proteico não ligado covalentemente – como um constituído por três enzimas (ilustradas aqui em vermelho, azul e verde) – favorece a dissociação do complexo em seus constituintes.

Vários tipos de evidências sugerem que, nas células, os complexos multienzimáticos asseguram a passagem eficiente do produto de uma reação enzimática para a próxima enzima da via. Esses complexos são chamados de **metabolons**. Certas enzimas do ciclo do ácido cítrico têm sido isoladas em conjunto como complexos supramoleculares, ou têm sido encontradas em associação com a membrana mitocondrial interna, ou se difundem na matriz mitocondrial mais lentamente do que o esperado para proteínas isoladas em solução. Existem fortes evidências da canalização de substratos através de complexos multienzimáticos em outras vias metabólicas, e muitas enzimas consideradas “solúveis” provavelmente atuam na célula em complexos altamente organizados que canalizam intermediários. Outros exemplos de canalização serão fornecidos na discussão da biossíntese de aminoácidos e nucleotídeos, no Capítulo 22.

Algumas mutações em enzimas do ciclo do ácido cítrico levam ao desenvolvimento de câncer

Quando os mecanismos da regulação de uma via como o ciclo do ácido cítrico são afetados por uma perturbação metabólica importante, o resultado pode ser uma doença grave. São raríssimas as mutações nas enzimas do ciclo do ácido cítrico em seres humanos e outros mamíferos, porém, quando ocorrem, são devastadoras. Defeitos genéticos no gene da fumarase levam a tumores no músculo liso (leiomas) e nos rins; mutações na succinato-desidrogenase levam a tumores da glândula suprarrenal (feocromocitomas). Nas células em cultura com essas mutações, o fumarato (no caso das mutações na fumarase) e, em menor extensão, o succinato (no caso das mutações na succinato-desidrogenase) acumulam-se, e esse acúmulo induz a expressão do fator de transcrição induzível por hipóxia HIF-1 α (HIF, do inglês, *hipoxia-inducible transcription factor*) (ver Quadro 14-1). O mecanismo que leva à formação do tumor pode ser a geração de um estado de pseudo-hipoxia. Nas células com essas mutações, ocorre maior expressão dos genes normalmente regulados por HIF-1 α . Esses efeitos das mutações nos genes da fumarase e da succinato-desidrogenase os definem como genes supressores de tumores (p. 484). Os metabólitos que se acumulam (fumarato e succinato) são chamados de oncometabólitos, devido à sua capacidade de favorecer a proliferação de células tumorais.

Outra conexão marcante entre os intermediários do ciclo do ácido cítrico e câncer é a descoberta que, em muitos tumores das células da glia (gliomas), a isocitrato-desidrogenase dependente de NADPH apresenta um defeito genético incomum. A enzima mutante perde sua atividade normal (de conversão do isocitrato em α -cetoglutarato), mas *ganha* uma nova atividade: ela converte α -cetoglutarato em 2-hidroxiglutarato (Figura 16-21), que se acumula nas células tumorais. α -Cetoglutarato e Fe³⁺ são cofatores essenciais para uma família de histonas-desmetilase, que alteram a expressão gênica pela remoção de grupos metila de resíduos de Arg e Lys nas histonas que organizam o DNA nuclear. Por competir com o α -cetoglutarato

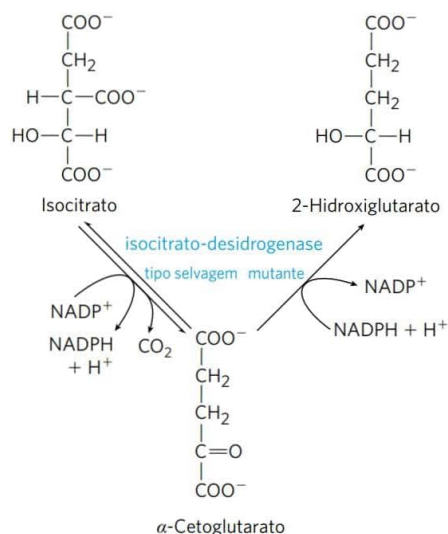


FIGURA 16-21 Uma isocitrato-desidrogenase mutante adquire uma nova atividade. A isocitrato-desidrogenase do tipo selvagem catalisa a conversão de isocitrato em α -cetoglutarato, porém mutações que alteram o sítio de ligação do isocitrato levam à perda da função da atividade enzimática normal e ao ganho de uma nova atividade: conversão de α -cetoglutarato em 2-hidroxiglutarato. O acúmulo deste produto inibe a histona-desmetilase, alterando a regulação gênica e levando a tumores das células gliais no encéfalo.

pela ligação às histonas-desmetilase, o 2-hidroxiglutarato inibe a atividade dessas enzimas. A inibição das histonas-desmetilase, por sua vez, interfere com a regulação gênica normal, levando ao crescimento descontrolado das células da glia. Enzimas da família de mais de 60 dioxigenases que utilizam α -cetoglutarato e Fe³⁺ como cofatores são também inibidas competitivamente pelo 2-hidroxiglutarato. A inibição de uma ou mais dessas enzimas pode interferir com a regulação normal da divisão celular e, assim, produzir tumores. ■

RESUMO 16.3 Regulação do ciclo do ácido cítrico

- A velocidade global do ciclo do ácido cítrico é controlada pela taxa de conversão do piruvato em acetil-CoA e pelo fluxo pelas enzimas citrato-sintase, isocitrato-desidrogenase e α -cetoglutarato-desidrogenase. Esses fluxos são determinados pelas concentrações dos substratos e dos produtos: os produtos finais ATP e NADH são inibidores, e os substratos NAD⁺ e ADP são estimuladores.
- A produção de acetil-CoA para o ciclo do ácido cítrico pelo complexo da PDH é inibida alostericamente pelos metabólitos que sinalizam a suficiência de energia metabólica (ATP, acetil-CoA, NADH e ácidos graxos), sendo estimulada pelos metabólitos que indicam um suprimento de energia reduzido (AMP, NAD⁺, CoA).
- Os complexos formados por enzimas em sequência em uma via possibilitam a canalização do substrato entre essas enzimas.

Termos-chave

Termos em negrito estão definidos no glossário.

respiração 619	enzimas
respiração celular 619	plurifuncionais 628
ciclo do ácido cítrico 619	complexo da α -cetoglutarato-
ciclo do ácido tricarboxílico (CAT) 619	-desidrogenase 630
ciclo de Krebs 619	sintases 631
carreador mitocondrial de piruvato (MPC) 620	sintetases 631
complexo da piruvato-	ligases 631
-desidrogenase (PDH) 620	liases 631
descarboxilação oxidativa 620	cinases 631
tioéster 621	fosforilases 631
lipoato 621	fosfatases 631
canalização do substrato 623	nucleosídeo-difosfato-cinase 632
centro de ferro-enxofre 627	molécula pró-quiral 634
	via anfibólica 636
	ciclo do glicoxilato 636
	reação anaplerótica 636
	biotina 638
	avidina 639
	metabólito 642

Teste seu conhecimento

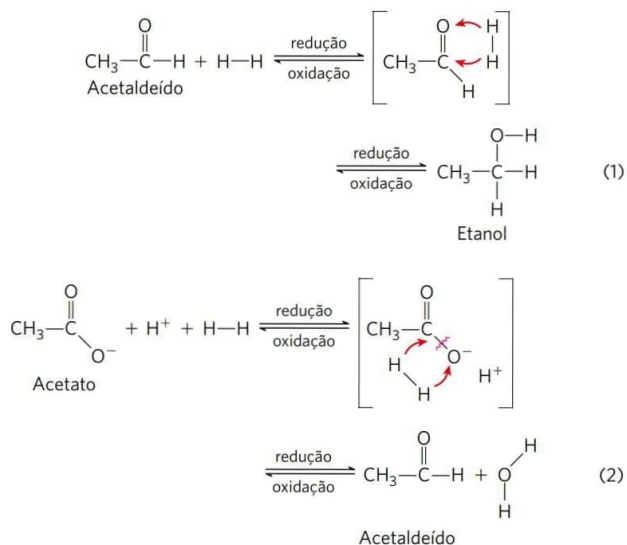
1. O balancete do ciclo do ácido cítrico O ciclo do ácido cítrico tem oito enzimas: citrato-sintase, aconitase, isocitrato-desidrogenase, α -cetoglutarato-desidrogenase, succinil-CoA-sintetase, succinato-desidrogenase, fumarase e malato-desidrogenase.

- Escreva uma equação equilibrada para a reação catalisada por cada enzima.
- Identifique o(s) cofator(es) necessário(s) para cada reação enzimática.
- Para cada enzima, determine, entre os seguintes tipos de reação, qual deles melhor descreve o(s) tipo(s) de reação(ões) catalisada(s): condensação (formação de ligação carbono-carbono); desidratação (perda de água); hidratação (adição de água); descarboxilação (perda de CO_2); oxidação-redução; fosforilação no nível de substrato; isomerização.
- Escreva uma reação líquida equilibrada para o catabolismo de acetil-CoA a CO_2 .

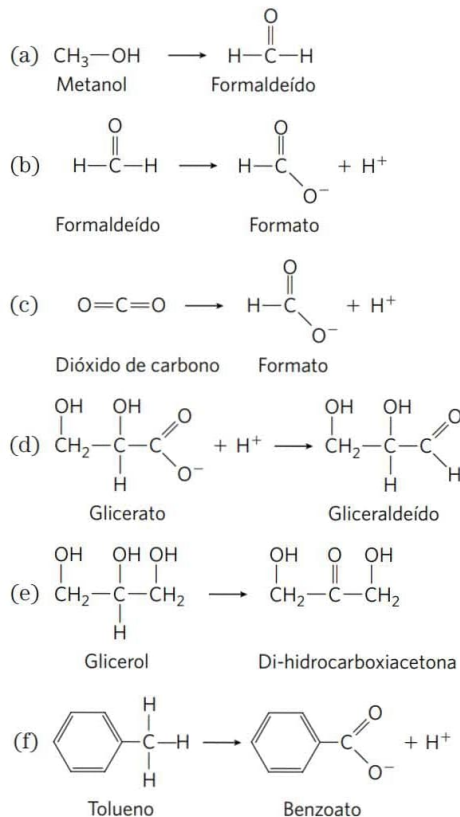
2. Equação líquida da glicólise e do ciclo do ácido cítrico Escreva a equação bioquímica líquida do metabolismo de uma molécula de glicose pela glicólise e pelo ciclo do ácido cítrico, incluindo todos os cofatores.

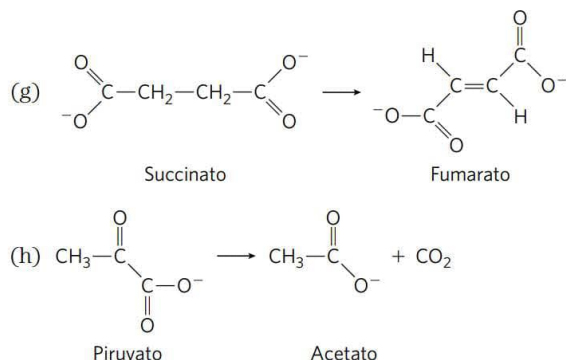
3. A identificação das reações de oxidação e redução Uma estratégia bioquímica de muitos organismos vivos é a oxidação gradual de compostos orgânicos a CO_2 e H_2O e a conservação da maior parte da energia assim produzida na forma de ATP. É importante ser capaz de reconhecer os processos de oxidação e redução no metabolismo. A redução de uma molécula orgânica é o resultado da hidrogenação de uma ligação dupla (Equação 1, a seguir) ou de uma ligação simples

com clivagem concomitante (Equação 2). Por outro lado, a oxidação é o resultado da desidrogenação. Nas reações bioquímicas *redox*, as coenzimas NAD e FAD desidrogenam/hidrogenam moléculas orgânicas na presença das enzimas apropriadas.



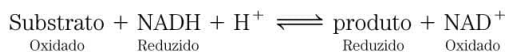
Para cada uma das transformações metabólicas de (a) a (f), determine se ocorreu uma oxidação ou uma redução. Equilibre cada transformação pela inserção de $\text{H}-\text{H}$ e, onde necessário, H_2O .



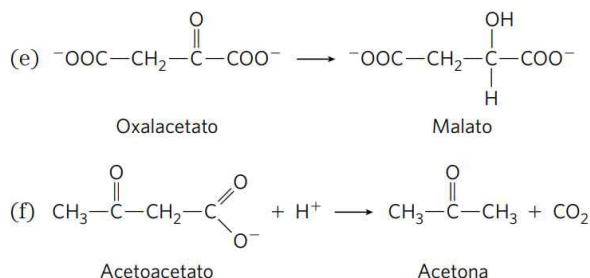
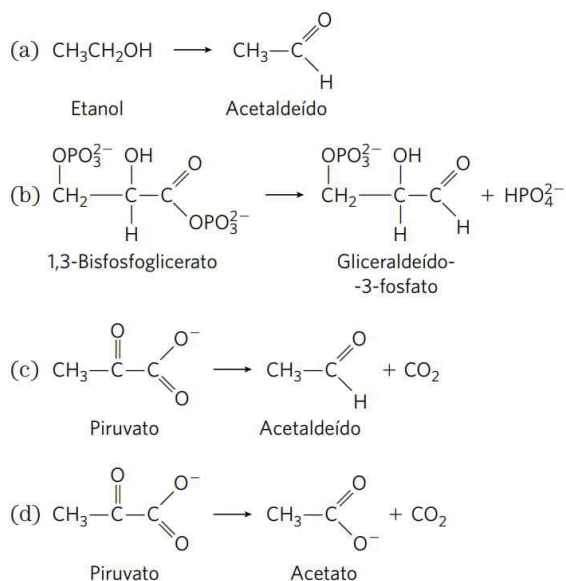


4. Relação entre a liberação de energia e o estado de oxidação do carbono Uma célula eucariótica pode utilizar glicose ($C_6H_{12}O_6$) e ácido hexanoico ($C_6H_{14}O_2$) como combustíveis para a respiração celular. Com base nas fórmulas estruturais, qual substância libera mais energia por grama na combustão completa a CO_2 e H_2O ?

5. Coenzimas de nicotinamida como transportadores redox reversíveis As coenzimas de nicotinamida (ver Figura 13-24) podem, com os substratos adequados e na presença da desidrogenase apropriada, sofrer reações reversíveis de oxidação-redução. Nessas reações, $NADH + H^+$ atua como fonte de hidrogênio, como descrito no Problema 3. Sempre que a coenzima for oxidada, um substrato deve ser simultaneamente reduzido:



Para cada uma das reações de (a) a (f) a seguir, determine se o substrato foi oxidado, reduzido ou se o estado de oxidação não foi alterado (ver Problema 3). Caso uma variação *redox* tenha ocorrido, equilibre a reação com a quantidade necessária de NAD^+ , $NADH$, H^+ e H_2O . O objetivo é reconhecer quando uma coenzima *redox* é necessária em uma reação metabólica.



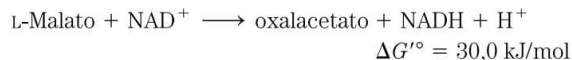
6. Cofatores e mecanismo da piruvato-desidrogenase Descreva a função de cada cofator envolvido na reação catalisada pelo complexo da piruvato-desidrogenase.

7. Deficiência de tiamina Indivíduos com dieta deficitária em tiamina têm níveis relativamente altos de piruvato na corrente sanguínea. Explique isso em termos bioquímicos.

8. A reação da isocitrato-desidrogenase Qual o tipo de reação química envolvido na conversão de isocitrato a α -cetoglutarato? Identifique e descreva a função de todos os cofatores. Que outra(s) reação(ões) do ciclo do ácido cítrico é(são) desse mesmo tipo?

9. Estímulo do consumo de oxigênio por oxalacetato e malato No início dos anos de 1930, Albert Szent-Györgyi publicou a interessante observação de que a adição de pequenas quantidades de oxalacetato ou malato a suspensões de um macerado do músculo peitoral de pombo estimulava o consumo de oxigênio da preparação. De modo surpreendente, a quantidade de oxigênio consumida era cerca de sete vezes maior do que a quantidade necessária para a oxidação completa (a CO_2 e H_2O) do oxalacetato ou malato adicionado. Por que a adição de oxalacetato ou malato estimulou o consumo de oxigênio? Por que a quantidade de oxigênio consumida era tão maior que a quantidade necessária para oxidar completamente o oxalacetato ou malato adicionado?

10. Formação de oxalacetato na mitocôndria Na última reação do ciclo do ácido cítrico, o malato é desidrogenado para regenerar o oxalacetato necessário para a entrada de acetil-CoA no ciclo:



- (a) Calcule a constante de equilíbrio a $25^\circ C$ para esta reação.
 (b) Uma vez que $\Delta G'^{\circ}$ presume um pH padrão de 7, a constante de equilíbrio calculada em (a) corresponde a

$$K'_{eq} = \frac{[\text{oxalacetato}][NADH]}{[L\text{-malato}][NAD^+]}$$

A concentração medida de L-malato nas mitocôndrias de fígado de rato é aproximadamente $0,20 \text{ mM}$ quando $[NAD^+]/[NADH]$ é igual a 10. Calcule a concentração de oxalacetato nessas mitocôndrias em pH 7.

- (c) Para avaliar a magnitude da concentração mitocondrial de oxalacetato, calcule o número de moléculas de oxalacetato em uma única mitocôndria do fígado de rato. Considere a mitocôndria como uma esfera de $2,0 \mu m$ de diâmetro.

11. Cofatores do ciclo do ácido cítrico Suponha que você tenha preparado um extrato mitocondrial que contém todas as enzimas solúveis da matriz, mas que perdeu (por diálise) todos os cofatores de baixa massa molecular. O que você deve adicionar ao extrato para que a preparação oxide acetil-CoA a CO_2 ?

12. Deficiência de riboflavina Como uma deficiência de riboflavina afetaria o funcionamento do ciclo do ácido cítrico? Explique sua resposta.

13. Conteúdo de oxalacetato Que fatores poderiam diminuir a quantidade de oxalacetato disponível para a atividade do ciclo do ácido cítrico? Como o oxalacetato pode ser repostado?

14. Rendimento energético do ciclo do ácido cítrico A reação catalisada pela succinil-CoA-sintetase produz o composto de alta energia GTP. Como a energia livre contida no GTP é incorporada ao conteúdo celular de ATP?

15. Estudos sobre respiração em mitocôndrias isoladas A respiração celular pode ser estudada em mitocôndrias isoladas pela medida do consumo de oxigênio sob diferentes condições. Se 0,01 M de malonato de sódio é adicionado a mitocôndrias respirando ativamente e utilizando piruvato como fonte de combustível, a respiração rapidamente cessa e um intermediário metabólico se acumula.

- Qual é a estrutura desse intermediário?
- Explique por que ele se acumula.
- Explique por que o consumo de oxigênio cessa.
- Além da remoção do malonato, como essa inibição da respiração pode ser superada? Explique.

16. Estudos com marcação em mitocôndrias isoladas As vias metabólicas dos compostos orgânicos têm sido frequentemente delineadas pelo uso de um substrato marcado radioativamente com o posterior acompanhamento do destino desse marcador.

- Como você poderia determinar se a glicose adicionada a uma suspensão de mitocôndrias isoladas é metabolizada a CO_2 e H_2O ?
- Suponha que você adicione um breve pulso de $[3\text{-}^{14}\text{C}]$ piruvato (marcado na posição da metila) às mitocôndrias. Após uma rodada do ciclo do ácido cítrico, qual é a posição do ^{14}C no oxalacetato? Explique seguindo o marcador ^{14}C ao longo da via. Quantas rodadas do ciclo são necessárias para que todo o $[3\text{-}^{14}\text{C}]$ piruvato seja liberado na forma de CO_2 ?

17. A via do CO_2 na gliconeogênese Na primeira etapa da gliconeogênese, a conversão de piruvato a fosfoenolpiruvato (PEP), o piruvato é carboxilado pela piruvato-carboxilase a oxalacetato, que é depois descarboxilado a PEP pela PEP-carboxicinase (Capítulo 14). Como a adição de CO_2 é seguida pela perda de CO_2 , você poderia esperar que, em experimentos com marcadores, o ^{14}C do $^{14}\text{CO}_2$ não fosse incorporado ao PEP, à glicose ou a qualquer outro intermediário da gliconeogênese. Entretanto, pesquisadores observaram que, quando uma preparação de fígado de rato sintetiza glicose na presença de $^{14}\text{CO}_2$, o ^{14}C lentamente aparece no PEP e, no devido tempo, aparece no C-3 e no C-4 da glicose. Como o marcador ^{14}C é incorporado ao PEP e à glicose? (Dica: durante a gliconeogênese na presença de $^{14}\text{CO}_2$, vários intermediários do ciclo do ácido cítrico com quatro carbonos também se tornam marcados.)

18. Catabolismo da $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ glicose Uma cultura bacteriana respirando ativamente é incubada brevemente com $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ glicose, e os intermediários do ciclo do ácido cítrico e da via glicolítica são isolados. Em que posição está o ^{14}C em cada um dos intermediários listados a seguir? Considere apenas a incorporação inicial de ^{14}C , na primeira passagem da glicose marcada pelas vias.

- Frutose-1,6-bisfosfato
- Gliceraldeído-3-fosfato
- Fosfoenolpiruvato
- Acetil-CoA
- Citrato
- α -Cetoglutarato
- Oxalacetato

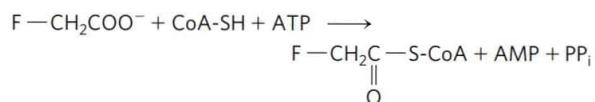


19. O papel da vitamina tiamina Pessoas com beribéri, doença causada pela deficiência de tiamina, apresentam níveis sanguíneos elevados de piruvato e α -cetoglutarato, principalmente após consumirem uma refeição rica em glicose. Como esses resultados se relacionam à deficiência de tiamina?

20. A síntese de oxalacetato pelo ciclo do ácido cítrico O oxalacetato é formado na última etapa do ciclo do ácido cítrico pela oxidação do L-malato, dependente de NAD^+ . A síntese líquida de oxalacetato a partir de acetil-CoA poderia ocorrer com o uso somente de enzimas e cofatores do ciclo do ácido cítrico, sem o esgotamento dos intermediários do ciclo? Explique. Como o oxalacetato que é desviado do ciclo (para reações biossintéticas) é repostado?

21. O esgotamento de oxalacetato O fígado de mamíferos pode efetuar a gliconeogênese utilizando oxalacetato como material de partida (Capítulo 14). A operação do ciclo do ácido cítrico seria afetada pela intensa utilização de oxalacetato para a gliconeogênese? Explique sua resposta.

22. O modo de ação do rodenticida fluoracetato O fluoroacetato, comercialmente preparado para o controle de roedores, também é produzido por uma planta sul-africana. Após entrar na célula, o fluoroacetato é convertido a fluoroacetil-CoA em uma reação catalisada pela enzima acetato-tiocinase:



O efeito tóxico do fluoroacetato foi estudado em um experimento utilizando o coração isolado e intacto de rato. Após o coração ser perfundido com 0,22 mM de fluoroacetato, as taxas medidas de captação de glicose e a glicólise diminuíram, e a glicose-6-fosfato e a frutose-6-fosfato ficaram acumuladas. O exame dos intermediários do ciclo do ácido cítrico revelou que suas concentrações estavam abaixo do normal, exceto pelo citrato, com uma concentração 10 vezes maior do que o normal.

- Onde ocorreu o bloqueio do ciclo do ácido cítrico? O que causou o acúmulo de citrato e o esgotamento dos outros intermediários?
- O fluoroacetil-CoA é enzimaticamente transformado pelo ciclo do ácido cítrico. Qual é a estrutura do produto final do metabolismo do fluoroacetato? Por que ele bloqueia o ciclo do ácido cítrico? Como a inibição pode ser superada?

- (c) Nos experimentos de perfusão cardíaca, por que a captação de glicose e a glicólise diminuíram? Por que as hexoses monofosfatadas se acumularam?
- (d) Por que o fluoroacetato é um veneno letal?

23. A síntese de L-malato na produção de vinhos A acidez de alguns vinhos é devida às altas concentrações de L-malato. Escreva uma sequência de reações mostrando como células de leveduras sintetizam L-malato a partir de glicose sob condições anaeróbicas na presença de CO_2 dissolvido (HCO_3^-). Observe que a reação global dessa fermentação não pode envolver o consumo de coenzimas de nicotinamida ou intermediários do ciclo do ácido cítrico.

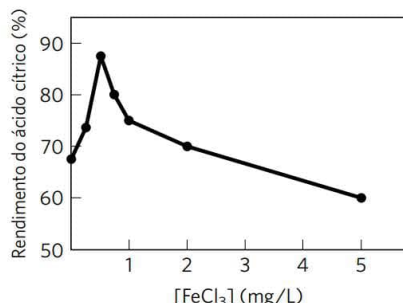
24. Síntese líquida de α -cetoglutarato O α -cetoglutarato desempenha um papel crucial na biossíntese de alguns aminoácidos. Escreva a sequência de reações enzimáticas que poderiam resultar na síntese líquida de α -cetoglutarato a partir de piruvato. A sequência de reações proposta não deve envolver o consumo líquido de outros intermediários do ciclo do ácido cítrico. Escreva uma equação para a reação global e identifique a fonte de cada reagente.

25. Vias antifóbicas Explique, dando exemplos, o significado da afirmação de que o ciclo do ácido cítrico é antifóbico.

26. Regulação do complexo da piruvato-desidrogenase Nos tecidos animais, a taxa de conversão de piruvato em acetil-CoA é regulada pela razão entre as formas ativa e fosforilada do complexo da PDH e inativa e desfosforilada. Determine o que acontece com a velocidade desta reação quando uma preparação de mitocôndrias de músculo de coelho contendo o complexo da PDH é tratada com (a) piruvato-desidrogenase-cinase, ATP e NADH; (b) piruvato-desidrogenase-fosfatase e Ca^{2+} ; (c) malonato.

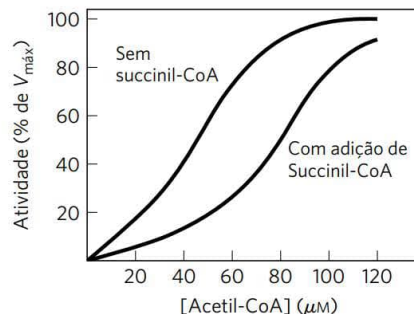
27. A síntese comercial de ácido cítrico O ácido cítrico é utilizado como agente flavorizante em refrigerantes, sucos de frutas e em muitos outros alimentos. Ao redor do mundo, o mercado do ácido cítrico está estimado em centenas de milhões de dólares por ano. A produção comercial utiliza o fungo *Aspergillus niger*, que metaboliza a sacarose sob condições cuidadosamente controladas.

- (a) O rendimento de ácido cítrico depende muito da concentração de FeCl_3 no meio de cultura, como indicado no gráfico. Por que o rendimento decresce quando a concentração de Fe^{3+} está acima ou abaixo do valor ótimo de 0,5 mg/L?
- (b) Escreva a sequência de reações pelas quais *A. niger* sintetiza ácido cítrico a partir de sacarose. Escreva uma equação para a reação global.



- (c) O processo comercial requer que o meio de cultura seja aerado? Em outras palavras, o processo é uma fermentação ou um processo aeróbico? Explique.

28. Regulação da citrato-sintase Na presença de quantidades saturantes de oxalacetato, a atividade da citrato-sintase do tecido cardíaco de porco mostra uma dependência sigmoide da concentração de acetil-CoA, como mostrado no gráfico a seguir. Quando succinil-CoA é adicionada, a curva é deslocada para a direita e a dependência sigmoide é mais pronunciada.



Com base nessas observações, sugira como a succinil-CoA regula a atividade da citrato-sintase. (Dica: ver Figura 6-35.) Por que a succinil-CoA é um sinal apropriado para a regulação do ciclo do ácido cítrico? Como a regulação da citrato-sintase controla a taxa de respiração celular no tecido cardíaco de porco?

29. Regulação da piruvato-carboxilase A carboxilação do piruvato pela piruvato-carboxilase ocorre em uma velocidade muito baixa, a não ser que acetil-CoA, um modulador alostérico positivo, esteja presente. Logo após uma refeição rica em ácidos graxos (triacilgliceróis), mas baixa em carboidratos (glicose), como essa propriedade de regulação desativa a oxidação de glicose a CO_2 e H_2O , mas aumenta a oxidação de acetil-CoA derivada de ácidos graxos?

30. A relação entre respiração e ciclo do ácido cítrico Embora o oxigênio não participe diretamente do ciclo do ácido cítrico, o ciclo somente opera quando O_2 está presente. Por quê?

31. O efeito da razão $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+]$ sobre o ciclo do ácido cítrico Como você espera que a operação do ciclo do ácido cítrico responda a um rápido aumento da razão $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+]$ na matriz mitocondrial? Por quê?

32. A termodinâmica da reação da citrato-sintase nas células O citrato é formado pela condensação de acetil-CoA e oxalacetato, catalisada pela citrato-sintase:



Em mitocôndrias de músculo cardíaco de rato, em pH 7,0 e a 25°C , as concentrações de reagentes e produtos são: oxalacetato, $1\ \mu\text{M}$; acetil-CoA, $1\ \mu\text{M}$; citrato, $220\ \mu\text{M}$; e CoA, $65\ \mu\text{M}$. A variação de energia livre padrão para a reação da citrato-sintase é $-32,2\ \text{kJ/mol}$. Qual é o sentido do fluxo de metabólitos na reação da citrato-sintase nas células cardíacas de rato? Explique.

33. As reações do complexo da piruvato-desidrogenase Duas das etapas da descarboxilação oxidativa do piruvato (etapas 4 e 5 na Figura 16-6) não envolvem nenhum dos três carbonos do piruvato, ainda que eles sejam essenciais para o funcionamento do complexo da PDH. Explique.

34. Mutantes do ciclo do ácido cítrico Existem muitos exemplos de doenças humanas nas quais uma ou outra atividade enzimática está ausente devido a mutações genéticas. Entretanto, doenças nas quais indivíduos careçam de uma das enzimas do ciclo do ácido cítrico são extremamente raras. Por quê?

Problema de análise de dados

35. Como foi descoberto o ciclo do ácido cítrico A bioquímica detalhada do ciclo do ácido cítrico foi determinada por diversos pesquisadores ao longo de décadas. Em um artigo de 1937, Krebs e Johnson resumiram seu trabalho e o trabalho de outros na primeira descrição publicada dessa via.

Os métodos utilizados por esses pesquisadores eram muito diferentes dos da bioquímica moderna. Marcadores radioativos não estavam comumente disponíveis até os anos 1940, de modo que Krebs e outros pesquisadores tiveram de utilizar técnicas sem marcadores para elucidar a via. Utilizando amostras frescas de músculo peitoral de pombo, eles determinaram o consumo de oxigênio, preparando uma suspensão do músculo macerado em tampão em um frasco lacrado e medindo o volume (em μL) de oxigênio consumido sob diferentes condições. Eles mediram os níveis de substratos (intermediários), tratando as amostras com ácido para a remoção das proteínas contaminantes, e, a seguir, dosaram as quantidades de várias moléculas orgânicas pequenas. As duas observações-chave que levaram Krebs e colaboradores a proporem o *ciclo* do ácido cítrico, em vez de uma *via linear* (como a glicólise), foram feitas nos seguintes experimentos.

Experimento I. Eles incubaram 460 mg de músculo macerado em 3 mL de tampão a 40°C por 150 minutos. A adição de *citrato* aumentou o consumo de O_2 em $893 \mu\text{L}$ em comparação com as amostras sem citrato. Eles calcularam, com base no consumo de O_2 durante a respiração usando outros compostos contendo carbono, que o consumo de O_2 esperado para a respiração completa desta quantidade de citrato seria de apenas $302 \mu\text{L}$.

Experimento II. Eles mediram o consumo de O_2 por 460 mg de músculo macerado em 3 mL de tampão quando incubado com *citrato* e/ou *1-fosfoglicerol* (glicerol-1-fosfato, o qual se sabia ser prontamente oxidado pela respiração celular) a 40°C por 140 minutos. Os resultados estão mostrados na tabela.

Amostra	Substrato(s) adicionado(s)	$\mu\text{L O}_2$ absorvidos
1	Sem substrato extra	342
2	0,3 mL 1-fosfoglicerol 0,2 M	757
3	0,15 mL citrato 0,02 M	431
4	0,3 mL 1-fosfoglicerol 0,2 M e 0,15 mL citrato 0,02 M	1.385

- Por que o consumo de O_2 é uma boa medida da respiração celular?
- Por que a amostra 1 (tecido muscular não suplementado) consome oxigênio?
- Com base nos resultados das amostras 2 e 3, você pode concluir que 1-fosfoglicerol e citrato atuam como substratos para a respiração celular neste sistema? Explique o raciocínio utilizado.

tos para a respiração celular neste sistema? Explique o raciocínio utilizado.

- Krebs e colaboradores utilizaram estes experimentos para argumentar que o citrato era “catalítico” – isto é, que auxiliava as amostras de tecido muscular a metabolizar o 1-fosfoglicerol de forma mais completa. Como você utilizaria os resultados deles para explicar esse argumento?
- Krebs e colaboradores também argumentaram que o citrato não era simplesmente consumido por essas reações, mas deveria ser *regenerado*. Portanto, as reações deveriam formar um *ciclo*, em vez de uma via linear. Como você embasaria esse argumento?

Outros pesquisadores descobriram que o *arsenato* (AsO_4^{3-}) inibe a α -cetoglutarato-desidrogenase e que o *malonato* inibe a succinato-desidrogenase.

- Krebs e colaboradores observaram que as amostras de tecido muscular tratadas com arsenato e citrato consumiriam o citrato apenas na presença de oxigênio e, sob essas condições, oxigênio seria consumido. Com base na via da Figura 16-7, a que molécula o citrato era convertido neste experimento, e por que as amostras consumiam oxigênio?

Em seu artigo, Krebs e Johnson também relataram o seguinte. (1) Na presença de arsenato, $5,48 \text{ mmol}$ de citrato eram convertidos em $5,07 \text{ mmol}$ de α -cetoglutarato. (2) Na presença de malonato, o citrato era quantitativamente convertido a grandes quantidades de succinato e pequenas quantidades de α -cetoglutarato. (3) A adição de oxalacetato na ausência de oxigênio levava à produção de uma grande quantidade de citrato; essa quantidade era aumentada quando glicose também fosse adicionada.

Outros pesquisadores haviam descoberto a seguinte rota em preparações similares de tecido muscular:

- Succinato \rightarrow fumarato \rightarrow malato \rightarrow oxalacetato \rightarrow piruvato
- Com base somente nos dados apresentados neste problema, qual é a sequência dos intermediários no ciclo do ácido cítrico? Como isso se compara à Figura 16-7? Explique o raciocínio utilizado.
 - Por que era importante mostrar a conversão *quantitativa* de citrato em α -cetoglutarato?

O artigo de Krebs e Johnson também apresenta outros resultados que elucidaram a maioria dos componentes ausentes do ciclo. O único componente que ficou indeterminado foi a molécula que reage com oxalacetato para formar citrato.

Referência

Krebs, H.A. e W.A. Johnson. 1937. The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues. *Enzymologia* 4:148–156. Reprinted in *FEBS Lett.* 117(Suppl.):K2–K10, 1980.

Esta página foi deixada em branco intencionalmente.

Catabolismo dos ácidos graxos

17.1 Digestão, mobilização e transporte de gorduras 650

17.2 Oxidação de ácidos graxos 654

17.3 Corpos cetônicos 668

A oxidação dos ácidos graxos de cadeia longa produzindo acetil-CoA é uma via central de geração de energia em muitos organismos e tecidos. No coração e no fígado de mamíferos, por exemplo, ela fornece até 80% das necessidades energéticas em todas as circunstâncias fisiológicas. Os elétrons retirados dos ácidos graxos durante a oxidação passam pela cadeia respiratória, levando à síntese de ATP; a acetil-CoA produzida a partir dos ácidos graxos pode ser completamente oxidada a CO_2 no ciclo do ácido cítrico, resultando em mais conservação de energia. Em algumas espécies e em alguns tecidos, a acetil-CoA tem destinos alternativos. No fígado, a acetil-CoA pode ser convertida em corpos cetônicos – combustíveis solúveis em água exportados para o encéfalo e para outros tecidos quando a glicose não está disponível. Em plantas vasculares, a acetil-CoA serve principalmente como precursor biossintético, e apenas secundariamente como combustível. Embora o papel biológico da oxidação dos ácidos graxos varie de acordo com o organismo, o mecanismo é essencialmente o mesmo. O processo repetitivo de quatro etapas, chamado de **β -oxidação**, por meio do qual os ácidos graxos são convertidos em acetil-CoA é o tópico principal deste capítulo.

No Capítulo 10, foram descritas as propriedades dos triacilgliceróis (também chamados de triglicerídeos ou gorduras neutras) que os tornam especialmente adequados como combustíveis de armazenamento. As cadeias alquílicas longas de seus ácidos graxos constituintes são essencialmente hidrocarbonetos, estruturas altamente reduzidas com uma energia de oxidação completa ($\sim 38 \text{ kJ/g}$) mais de duas vezes maior que a produzida pelo mesmo peso de carboidratos ou proteínas. Essa vantagem é devida também à extrema insolubilidade dos lipídeos em água; os triacilgliceróis celulares agregam-se em gotículas lipídicas, que não aumentam a osmolaridade do citosol e não são solvatadas. (Nos polissacarídeos de armazenamento, ao contrário, a água de solvatação pode ser responsável por dois terços do peso total das moléculas armazenadas.) E devido à sua

relativa inércia química, os triacilgliceróis podem ser armazenados em grande quantidade nas células, sem o risco de reações químicas indesejáveis com outros constituintes celulares.

As propriedades que tornam os triacilgliceróis bons compostos de armazenamento, no entanto, apresentam problemas em seu papel como combustível. Por serem insolúveis em água, os triacilgliceróis ingeridos devem ser emulsificados antes que possam ser digeridos por enzimas hidrossolúveis no intestino, e os triacilgliceróis absorvidos no intestino ou mobilizados dos tecidos de armazenamento devem ser carregados no sangue ligados a proteínas que contrabalançam a sua insolubilidade. Além disso, para superar a estabilidade relativa das ligações C-C em um ácido graxo, o grupo carboxila do C-1 é ativado pela ligação à coenzima A, que permite a oxidação gradativa do C-3 do grupo acila graxo, ou carbono β – daí o nome **β -oxidação**.

Este capítulo inicia com uma breve discussão sobre as fontes de ácidos graxos e sobre as vias pelas quais eles se deslocam até o seu sítio de oxidação, com ênfase especial no processo em vertebrados. Em seguida, descreveremos as etapas químicas da oxidação dos ácidos graxos nas mitocôndrias. A oxidação completa dos ácidos graxos a CO_2 e H_2O ocorre em três estágios: a oxidação dos ácidos graxos de cadeia longa a fragmentos de dois carbonos, na forma de acetil-CoA (**β -oxidação**); a oxidação de acetil-CoA a CO_2 no ciclo do ácido cítrico (Capítulo 16); e a transferência de elétrons de coenzimas (transportadoras de elétrons) reduzidas à cadeia respiratória mitocondrial (Capítulo 19). Neste capítulo, será apresentado o primeiro desses estágios. A discussão sobre a **β -oxidação** inicia com o caso simples no qual um ácido graxo completamente saturado com um número par de átomos de carbono é degradado a acetil-CoA. Então, serão analisadas brevemente as transformações extras necessárias para a degradação de ácidos graxos insaturados e ácidos graxos com um número ímpar de carbonos. Por fim, serão discutidas as variações sobre o tema da **β -oxidação** nas organelas especializadas – peroxissomos e glioissomos – e duas vias menos comuns do catabolismo dos ácidos graxos, as oxidações ω e α . O capítulo é concluído com uma descrição de um destino alternativo para a acetil-CoA formada pela **β -oxidação** em vertebrados: a produção de corpos cetônicos no fígado.

17.1 Digestão, mobilização e transporte de gorduras

As células podem obter ácidos graxos combustíveis de quatro fontes: gorduras consumidas na dieta, gorduras armazenadas nas células como gotículas de lipídeos, gorduras sintetizadas em um órgão para exportação a outro e gorduras obtidas por autofagia (a degradação das próprias organelas celulares). Algumas espécies utilizam as quatro fontes sob várias circunstâncias, outras utilizam uma ou duas delas. Os vertebrados, por exemplo, obtêm gorduras na dieta, mobilizam gorduras armazenadas em tecidos especializados (tecido adiposo, consistindo em células chamadas de adipócitos) e, no fígado, convertem o excesso dos carboidratos da dieta em gordura para a exportação a outros tecidos. Na falta de nutrientes, eles também podem reciclar lipídeos por autofagia. Em média, 40% ou mais das necessidades energéticas diárias das pessoas que vivem em países altamente industrializados são supridos pelos triacilgliceróis da dieta (embora a maioria das diretrizes nutricionais recomende que o consumo diário de gorduras não ultrapasse 30% da ingestão de calorias). Os triacilgliceróis fornecem mais da metade das necessidades energéticas de alguns órgãos, particularmente o fígado, o coração e a musculatura esquelética em repouso. Os triacilgliceróis armazenados são praticamente a única fonte de energia dos animais hibernantes e das aves

migratórias. Os protistas obtêm gorduras consumindo organismos mais abaixo na cadeia alimentar e alguns também armazenam gorduras como gotículas citosólicas de lipídeos. As plantas vasculares mobilizam gorduras armazenadas nas sementes durante a germinação, porém, em outras situações, não dependem de gorduras para a obtenção de energia.

As gorduras da dieta são absorvidas no intestino delgado

Nos vertebrados, antes que os triacilgliceróis possam ser absorvidos através da parede intestinal, eles precisam ser convertidos de partículas de gordura macroscópicas insolúveis em micelas microscópicas finamente dispersas. Essa solubilização é realizada pelos sais biliares, como o ácido taurocólico (p. 374), que são sintetizados a partir do colesterol no fígado, armazenados na vesícula biliar e liberados no intestino delgado após a ingestão de uma refeição gordurosa. Os sais biliares são compostos anfipáticos que atuam como detergentes biológicos, convertendo as gorduras da dieta em micelas mistas de sais biliares e triacilgliceróis (**Figura 17-1**, etapa 1). A formação de micelas aumenta muito a fração de moléculas de lipídeos acessíveis à ação das lipases hidrossolúveis no intestino, e a ação das lipases converte os triacilgliceróis em monoacilgliceróis (monoglicérides) e diacilgliceróis (diglicérides), ácidos graxos livres e glicerol (etapa 2). Esses produtos da ação de lipases

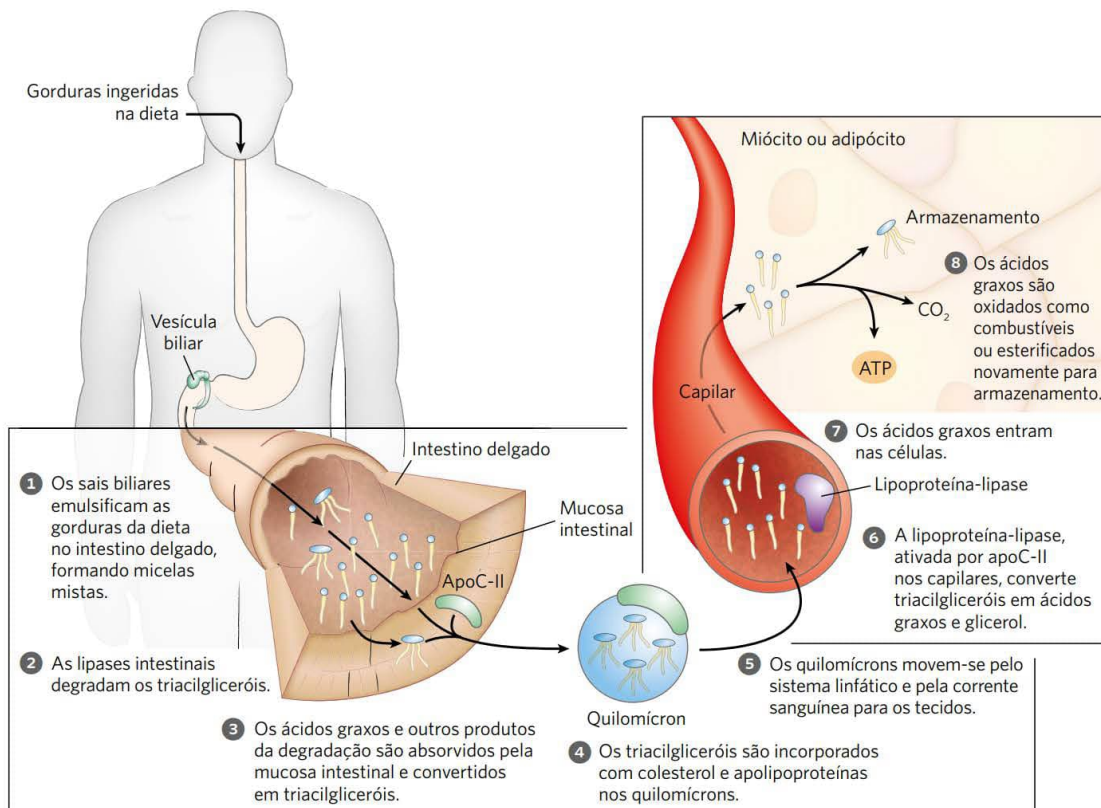


FIGURA 17-1 O processamento dos lipídeos da dieta em vertebrados. A digestão e a absorção dos lipídeos da dieta ocorrem no intestino delgado, e os ácidos graxos liberados dos triacilgliceróis são empacotados e distribuídos para os músculos e o tecido adiposo. Os oito passos são discutidos no texto.

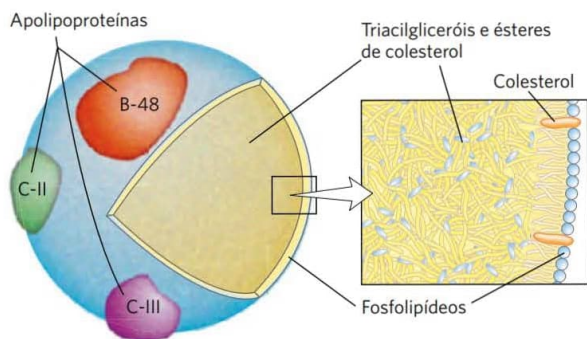


FIGURA 17-2 Estrutura molecular de um quilomícron. A superfície é formada por uma camada de fosfolípidos, com os grupos polares em contato com a fase aquosa. Os triacilgliceróis sequestrados no interior (em amarelo) representam mais de 80% da massa do quilomícron. Várias apolipoproteínas que se projetam da superfície (B-48, C-II, C-III) atuam como sinalizadores na captação e no metabolismo do conteúdo dos quilomícrons. O diâmetro dos quilomícrons varia entre aproximadamente 100 e 500 nm.

se difundem para dentro das células epiteliais que revestem a superfície intestinal (a mucosa intestinal) (etapa 3), onde são reconvertidos em triacilgliceróis e empacotados com o colesterol da dieta e com proteínas específicas em agregados lipoproteicos, chamados de **quilomícrons** (Figura 17-2; ver também Figura 17-1, etapa 4).

As **apolipoproteínas** são proteínas de ligação a lipídeos no sangue, responsáveis pelo transporte de triacilgliceróis, fosfolípidos, colesterol e ésteres de colesterol entre os órgãos. As apolipoproteínas (“apo” significa “destacado” ou “separado”, designando a proteína em sua forma livre de lipídeos) combinam-se com os lipídeos para formar várias classes de partículas de **lipoproteínas**, que são agregados esféricos com lipídeos hidrofóbicos no centro e cadeias laterais hidrofílicas de proteínas e grupos polares de lipídeos na superfície. Várias combinações de lipídeos e proteínas produzem partículas de densidades diferentes, variando de quilomícrons e lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL, do inglês, *very low density lipoproteins*) a lipoproteínas de densidade muito alta (HDL, do inglês, *very high density lipoproteins*), que podem ser separadas por ultracentrifugação. As estruturas dessas partículas de lipoproteínas e seus papéis no transporte de lipídeos estão detalhados no Capítulo 21.

As porções proteicas das lipoproteínas são reconhecidas por receptores nas superfícies celulares. Na absorção de lipídeos no intestino, os quilomícrons, que contêm a apolipoproteína C-II (apoC-II), deslocam-se da mucosa intestinal para o sistema linfático e, então, entram no sangue, que os carrega para os músculos e o tecido adiposo (Figura 17-1, etapa 5). Nos capilares desses tecidos, a enzima extracelular **lipase lipoproteica**, ativada pela apoC-II, hidrolisa os triacilgliceróis em ácidos graxos e glicerol (etapa 6), que são captados via transportadores específicos nas membranas plasmáticas de células nos tecidos-alvo (etapa 7). No músculo, os ácidos graxos são oxidados para obter energia; no tecido adiposo, eles são reesterificados para armazenamento na forma de triacilgliceróis (etapa 8).

Os remanescentes dos quilomícrons, desprovidos da maioria dos seus triacilgliceróis, mas ainda contendo colesterol e apolipoproteínas, deslocam-se pelo sangue até o fígado, onde são captados por endocitose mediada por receptores para as suas apolipoproteínas. Os triacilgliceróis que entram no fígado por essa via podem ser oxidados para fornecer energia ou precursores para a síntese de corpos cetônicos, como descrito na Seção 17.3. Quando a dieta contém mais ácidos graxos do que o necessário imediatamente como combustível ou como precursores, o fígado os converte em triacilgliceróis, empacotados com apolipoproteínas específicas, formando VLDL. As VLDL são secretadas pelos hepatócitos e transportadas pelo sangue até o tecido adiposo, onde os triacilgliceróis são removidos da circulação e armazenados em gotículas lipídicas dentro dos adipócitos.

Hormônios ativam a mobilização dos triacilgliceróis armazenados

Os lipídeos neutros são armazenados nos adipócitos (e nas células que sintetizam esteroides do córtex da glândula suprarrenal, dos ovários e dos testículos) na forma de **gotículas lipídicas**, com um centro de triacilgliceróis e ésteres de esteróis envoltos por uma monocamada de fosfolípidos. A superfície dessas gotículas é revestida por **perilipinas**, uma família de proteínas que restringem o acesso às gotículas lipídicas, evitando a mobilização prematura dos lipídeos. Quando hormônios sinalizam a necessidade de energia metabólica, os triacilgliceróis armazenados no tecido adiposo são mobilizados (retirados do armazenamento) e transportados aos tecidos (musculatura esquelética, coração e córtex renal), nos quais os ácidos graxos podem ser oxidados para a produção de energia. Os hormônios adrenalina e glucagon, secretados em resposta aos baixos níveis de glicose ou à situação de luta-ou-fuga (atividade iminente), estimulam a enzima adenilil-ciclase na membrana plasmática dos adipócitos (Figura 17-3), que produz o segundo mensageiro intracelular AMP cíclico (cAMP; ver Figura 12-4). A proteína-quinase dependente de cAMP (PKA) leva a mudanças que abrem a gotícula de lipídeo, permitindo a atividade de três lipases citosólicas, as quais atuam sobre tri, di e monoacilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol.

Os ácidos graxos assim liberados (**ácidos graxos livres, AGL**) passam dos adipócitos para o sangue, onde eles se ligam à proteína circulante **albumina sérica** (Figura 17-3). Essa proteína (M_r 66.000), que representa cerca da metade da proteína sérica total, liga-se de modo não covalente a até 10 ácidos graxos por monômero de proteína. Ligados a essa proteína solúvel, os ácidos graxos, que de outra maneira seriam insolúveis, são transportados a tecidos como o músculo esquelético, o coração e o córtex renal. Nesses tecidos-alvo, os ácidos graxos dissociam-se da albumina e são levados por transportadores da membrana plasmática para dentro das células para servir de combustível.

Cerca de 95% da energia biologicamente disponível dos triacilgliceróis residem nas suas três cadeias longas de ácidos graxos; apenas 5% são fornecidos pela porção glicerol. O glicerol liberado pela ação da lipase é fosforilado pela **glicerol-cinase** (Figura 17-4), e o glicerol-3-fosfato

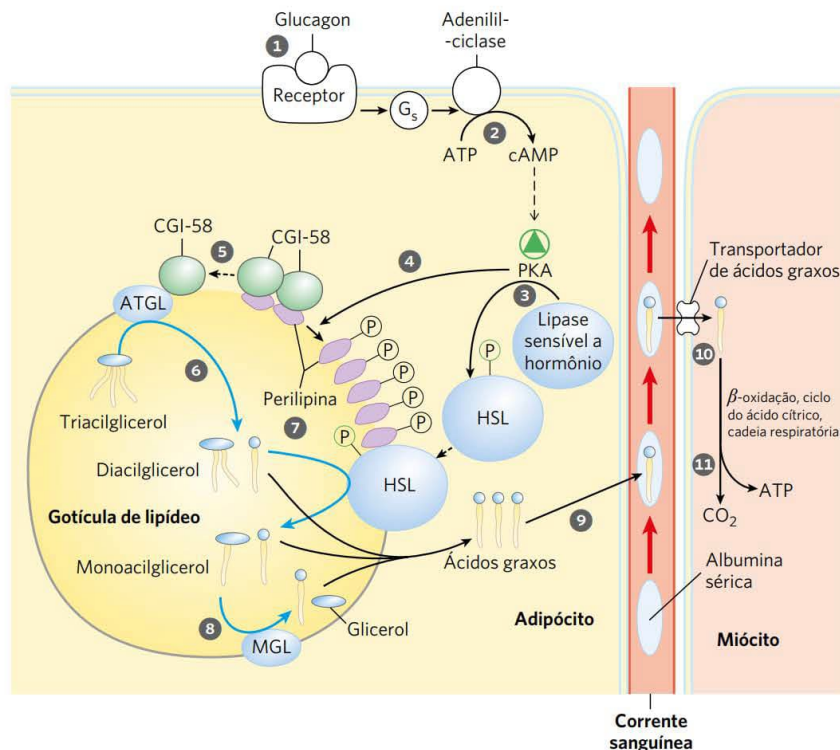


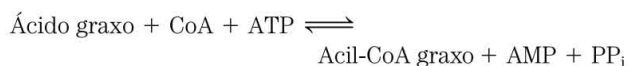
FIGURA 17-3 Mobilização dos triacilgliceróis armazenados no tecido adiposo. Quando os níveis baixos de glicose no sangue ativam a liberação de glucagon, ① o hormônio liga-se ao seu receptor na membrana do adipócito e, assim, ② estimula a adenilil-ciclase, via uma proteína G, a produzir cAMP. Isso ativa a PKA, que fosforila ③ a lipase sensível a hormônios (HSL) e ④ as moléculas de perilipina na superfície da gotícula lipídica. A fosforilação da perilipina causa a ⑤ dissociação da proteína CGI-58 da perilipina. A CGI-58 então recruta a lipase de triacilgliceróis do tecido adiposo (ATGL, do inglês, *adipose triacylglycerol lipase*) para a superfície da gotícula e estimula sua atividade lipásica. A ATGL ativada ⑥ converte triacilgliceróis em diacilgliceróis. A perilipina fosforilada associa-se com a lipase sensível a hormônios fosforilada, permitindo seu acesso à superfície da gotícula lipídica, onde ⑦ ela hidrolisa os diacilgliceróis em monoacilgliceróis. Uma terceira lipase, a monoacilglicerol-lipase (MGL) ⑧ hidrolisa os monoacilgliceróis. ⑨ Os ácidos graxos deixam o adipócito e são transportados no sangue ligados à albumina sérica. Eles são posteriormente liberados da albumina e ⑩ são captados por um miócito via um transportador específico para ácidos graxos. ⑪ No miócito, os ácidos graxos são oxidados a CO_2 , e a energia da oxidação é conservada em ATP, que fornece energia para a contração muscular e para outros processos metabólicos que necessitam de energia no miócito.

resultante é oxidado a di-hidroxiacetona fosfato. A enzima glicolítica triose-fosfato-isomerase converte esse composto em gliceraldeído-3-fosfato, que é oxidado na glicólise.

Os ácidos graxos são ativados e transportados para dentro das mitocôndrias

As enzimas da oxidação de ácidos graxos nas células animais estão localizadas na matriz mitocondrial, como demonstrado em 1948 por Eugene P. Kennedy e Albert Lehninger. Os ácidos graxos com comprimento de 12 carbonos ou menos entram na mitocôndria sem a ajuda de transportadores de membrana. Aqueles com 14 carbonos ou mais, que constituem a maioria dos ácidos graxos livres obtidos na dieta ou liberados do tecido adiposo, não conseguem passar livremente através das membranas mitocondriais – primeiro eles precisam passar pelas três reações enzimáticas da **lançadeira da carnitina**. A primeira dessas reações é catalisada por uma família de isozimas da **acil-CoA-sintetase**, que apresenta especificidade para ácidos graxos de cadeias carbonadas curtas, intermediárias ou lon-

gas. As isozimas estão presentes na membrana mitocondrial externa, onde promovem a reação geral



Assim, as acil-CoA-sintetases catalisam a formação de uma ligação tioéster entre o grupo carboxila do ácido graxo e o grupo tiol da coenzima A para produzir uma **acil-CoA graxo**, em uma reação acoplada à clivagem do ATP em AMP e PP_i . (Lembre-se da descrição dessa reação no Capítulo 13, para ilustrar como a energia livre liberada pela clivagem das ligações fosfoanidrido do ATP pode ser acoplada à formação de um composto de alta energia; p. 514.) A reação ocorre em dois passos e envolve um intermediário acil-adenilil (**Figura 17-5**).

Acil-CoAs, como a acetil-CoA, são compostos de alta energia; a sua hidrólise a ácidos graxos livres e CoA tem uma grande variação negativa de energia livre padrão ($\Delta G^\circ = -31 \text{ kJ/mol}$). A formação de uma acil-CoA torna-se mais favorável pela hidrólise de *duas* ligações de alta

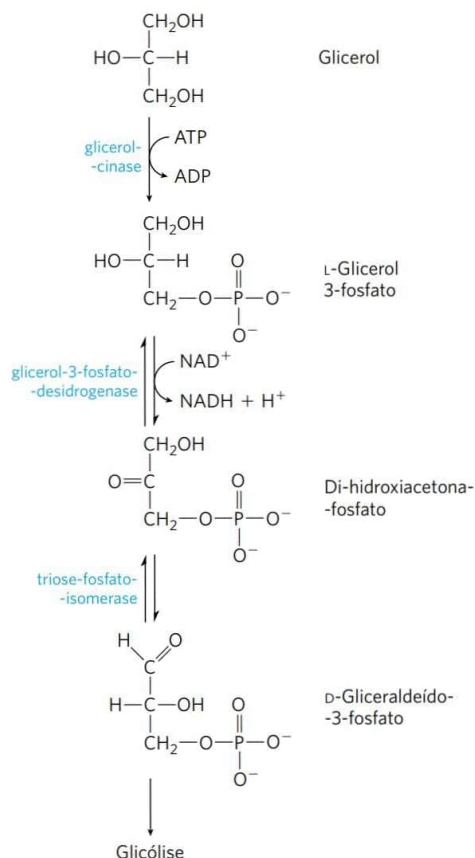
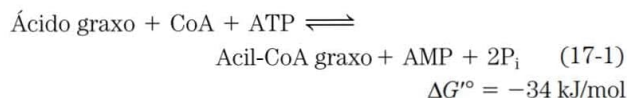


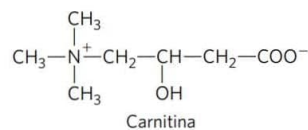
FIGURA 17-4 A entrada do glicérol na via glicolítica.

energia do ATP; o pirofosfato formado na reação de ativação é imediatamente hidrolisado pela pirofosfatase inorgânica (lado esquerdo da Figura 17-5), que puxa a reação de ativação precedente no sentido da formação de acil-CoA. A reação total é



Os ésteres de acil-CoA formados no lado citosólico da membrana externa da mitocôndria podem ser transpor-

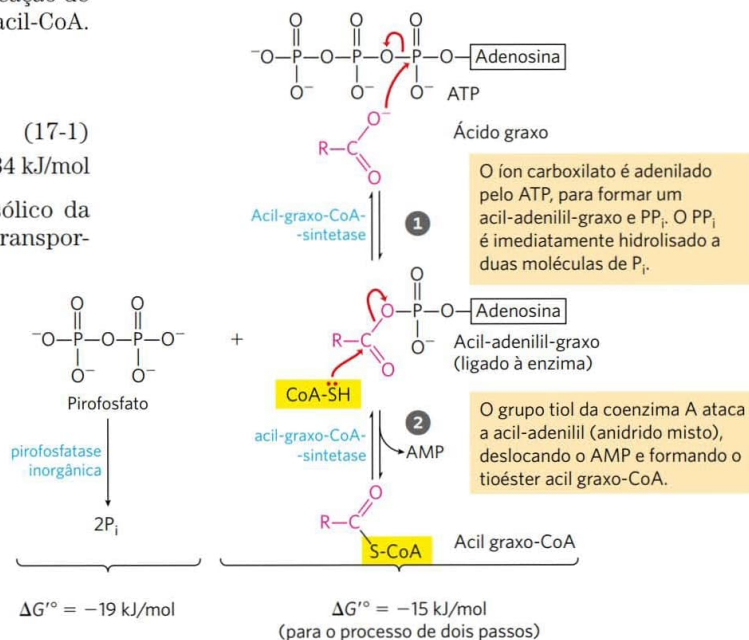
tados para dentro da mitocôndria e oxidados para produzir ATP, ou podem ser utilizados no citosol para sintetizar lipídeos de membrana. Os ácidos graxos destinados à oxidação mitocondrial são ligados transitoriamente ao grupo hidroxila da **carnitina**, formando acil-carnitina – a segunda reação do ciclo.



Essa transesterificação é catalisada pela **carnitina-aciltransferase 1** (também chamada de **carnitina-palmitoiltransferase 1, CPT1**), na membrana externa (Figura 17-6). A acil-CoA é convertida no éster de carnitina à medida que passa através da membrana externa. O éster de acil-carnitina, então, entra na matriz por difusão facilitada através do **cotransportador acil-carnitina/carnitina** da membrana mitocondrial interna. Esse cotransportador move uma molécula de carnitina da matriz para o espaço intermembrana enquanto uma molécula de acil-carnitina é levada para a matriz.

No terceiro e último passo da lançadeira da carnitina, o grupo acila é enzimaticamente transferido da carnitina para a coenzima A intramitocondrial pela **carnitina-aciltransferase 2** (também chamada de **CPT2**). Essa isoenzima, localizada na face interna da membrana mitocondrial interna, regenera acil-CoA de cadeia longa e a libera, juntamente com a carnitina livre, dentro da matriz (Figura 17-6).

Esse processo de três passos para transferir os ácidos graxos para dentro da mitocôndria – esterificação com CoA, transesterificação com carnitina, seguida de transporte e transesterificação de volta a CoA – liga dois reservatórios de coenzima A e de acil-CoA, um no citosol e



MECANISMO-FIGURA 17-5 Ativação de um ácido graxo pela conversão a acil-CoA. A conversão é catalisada pela acil-CoA-sintetase e pela pirofosfatase inorgânica. A formação do derivado acil-CoA ocorre em duas etapas. A reação total é altamente exergônica.

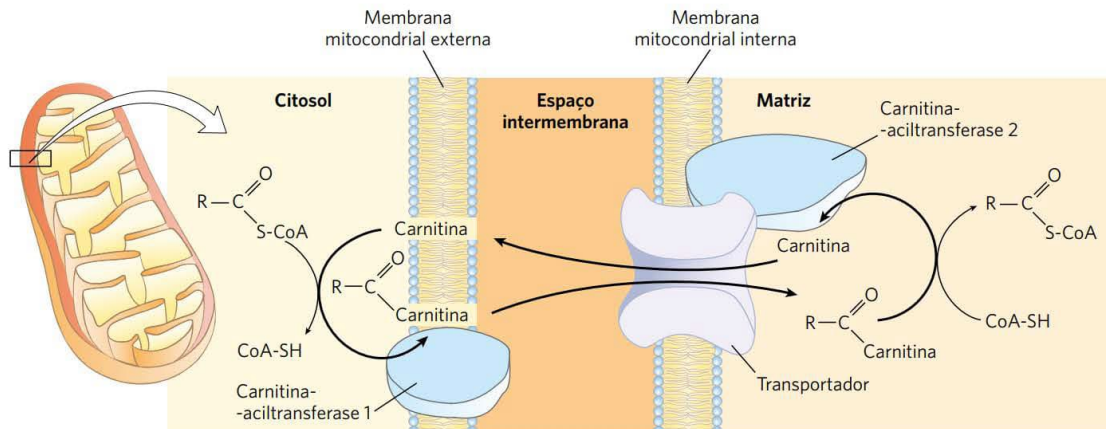


FIGURA 17-6 Entrada de ácido graxo na mitocôndria pelo transportador acil-carnitina/carnitina. Após a formação da acil-carnitina na membrana externa ou no espaço intermembrana, ela se desloca para a matriz pela difusão facilitada por meio do transportador na membrana interna. Na matriz, o grupo acila é transferido para a coenzima A mitocondrial, liberando a carnitina para retornar ao espaço intermembrana pelo mesmo transportador. A carnitina-aciltransferase 1 é inibida por malonil-CoA, o primeiro intermediário na síntese de ácidos graxos (ver Figura 21-2). Essa inibição evita a síntese e a degradação simultâneas dos ácidos graxos.

o outro na mitocôndria. Esses reservatórios têm funções diferentes. A coenzima A na matriz mitocondrial é amplamente utilizada na degradação oxidativa do piruvato, dos ácidos graxos e de alguns aminoácidos, ao passo que a coenzima A citosólica é utilizada na biossíntese de ácidos graxos (ver Figura 21-10). A acil-CoA graxa no reservatório citosólico pode ser utilizada para síntese de lipídeos de membrana ou pode ser transportada para dentro da matriz mitocondrial para oxidação e produção de ATP. A conversão ao éster de carnitina compromete a porção acila com o destino oxidativo.

O processo de entrada mediado pela carnitina é o passo limitante para a oxidação dos ácidos graxos na mitocôndria e, como discutido mais adiante, é um ponto de regulação. Uma vez dentro da mitocôndria, a acil-CoA sofre a ação de um conjunto de enzimas da matriz.

RESUMO 17.1 Digestão, mobilização e transporte de gorduras

- Os ácidos graxos dos triacilgliceróis fornecem uma grande fração da energia oxidativa nos animais. Os triacilgliceróis da dieta são emulsificados no intestino delgado por sais biliares, hidrolisados pelas lipases intestinais, absorvidos pelas células epiteliais intestinais, reconvertidos em triacilgliceróis e, então, transformados em quilomícrons pela combinação com apolipoproteínas específicas.
- Os quilomícrons levam os triacilgliceróis aos tecidos, onde a lipase lipoproteica libera ácidos graxos livres para a entrada nas células. Os triacilgliceróis armazenados no tecido adiposo são mobilizados por uma lipase de triacilgliceróis sensível a hormônio. Os ácidos graxos liberados ligam-se à albumina sérica e são transportados no sangue para o coração, a musculatura esquelética e outros tecidos que utilizam ácidos graxos como combustíveis.

- Uma vez dentro das células, os ácidos graxos são ativados na membrana mitocondrial externa pela conversão em tioésteres de acil-CoA. A acil-CoA de cadeia longa que será oxidada entra na mitocôndria em três passos, pela lançadeira da carnitina.

17.2 Oxidação de ácidos graxos

Conforme observado anteriormente, a oxidação mitocondrial dos ácidos graxos ocorre em três etapas (Figura 17-7). Na primeira etapa – β -oxidação –, os ácidos graxos sofrem remoção oxidativa de sucessivas unidades de dois carbonos na forma de acetil-CoA, começando pela extremidade carboxílica da cadeia da acila. Por exemplo, o ácido palmítico de 16 carbonos (palmitato em pH 7) passa sete vezes pela sequência oxidativa, perdendo dois carbonos como acetil-CoA em cada passagem. Ao final de sete ciclos, os dois últimos carbonos do palmitato (originalmente C-15 e C-16) permanecem como acetil-CoA. O resultado global é a conversão da cadeia de 16 carbonos do palmitato em oito grupos acetila de dois carbonos das moléculas de acetil-CoA. A formação de cada acetil-CoA requer a remoção de quatro átomos de hidrogênio (dois pares de elétrons e quatro H^+) da porção acila pelas desidrogenases.

Na segunda etapa da oxidação de ácidos graxos, os grupos acetila da acetil-CoA são oxidados a CO_2 no ciclo do ácido cítrico, que também ocorre na matriz mitocondrial. A acetil-CoA derivada dos ácidos graxos, então, entra em uma via de oxidação final comum à acetil-CoA derivada da glicose, procedente da glicólise e da oxidação do piruvato (ver Figura 16-1). As duas primeiras etapas da oxidação dos ácidos graxos produzem os transportadores de elétrons reduzidos NADH e $FADH_2$, que, na terceira etapa, doam elétrons para a cadeia respiratória mitocondrial, por meio da qual os elétrons passam para o oxigênio com a fosforilação concomitante de ADP a ATP (Figura 17-7). A energia liberada pela oxidação dos ácidos graxos é, portanto, conservada como ATP.

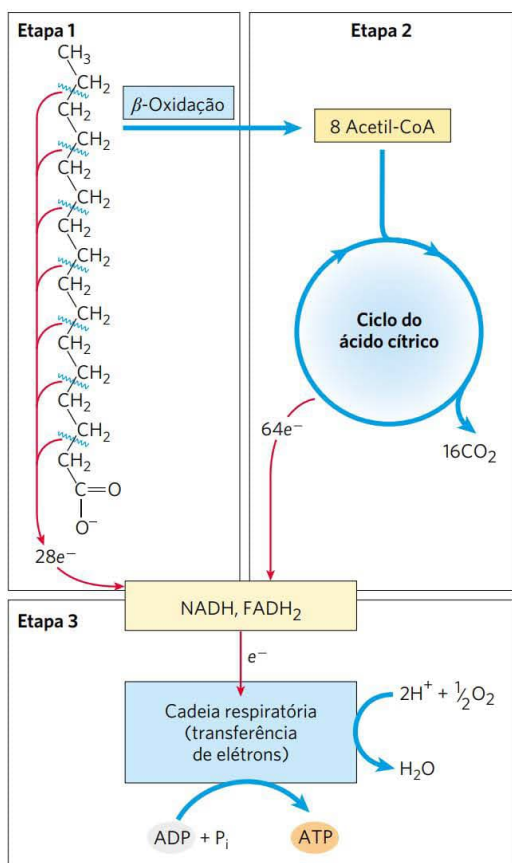


FIGURA 17-7 Etapas da oxidação dos ácidos graxos. Etapa 1: um ácido graxo de cadeia longa é oxidado para produzir resíduos de acetila na forma de acetil-CoA. Esse processo é chamado de β -oxidação. Etapa 2: os grupos acetila são oxidados a CO_2 no ciclo do ácido cítrico. Etapa 3: os elétrons derivados das oxidações das etapas 1 e 2 passam ao O_2 por meio da cadeia respiratória mitocondrial, fornecendo a energia para a síntese de ATP por fosforilação oxidativa.

Agora, será analisada com mais atenção a primeira etapa da oxidação dos ácidos graxos, começando com o caso simples de uma cadeia acila longa saturada com um número par de carbonos, então passando para os casos um pouco mais complexos das cadeias insaturadas ou de número ímpar. Também será abordada a regulação da oxidação de ácidos graxos, os processos β -oxidativos que ocorrem em outras

organelas que não na mitocôndria e, finalmente, duas maneiras menos comuns de catabolismo de ácidos graxos, as oxidações α e ω .

A β -oxidação de ácidos graxos saturados tem quatro passos básicos

Quatro reações catalisadas por enzimas constituem a primeira etapa da oxidação de ácidos graxos (**Figura 17-8a**). Primeiro, a desidrogenação da acil-CoA produz uma ligação dupla entre os átomos de carbono α e β (C-2 e C-3), produzindo uma ***trans*- Δ^2 -enoil-CoA** (o símbolo Δ^2 designa a posição da ligação dupla; você pode querer rever a nomenclatura dos ácidos graxos, p. 361.) Observe que a nova ligação dupla tem configuração *trans*, ao passo que as li-

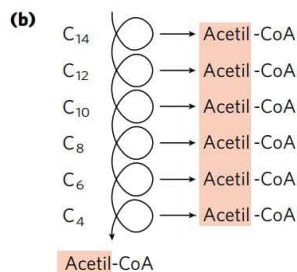
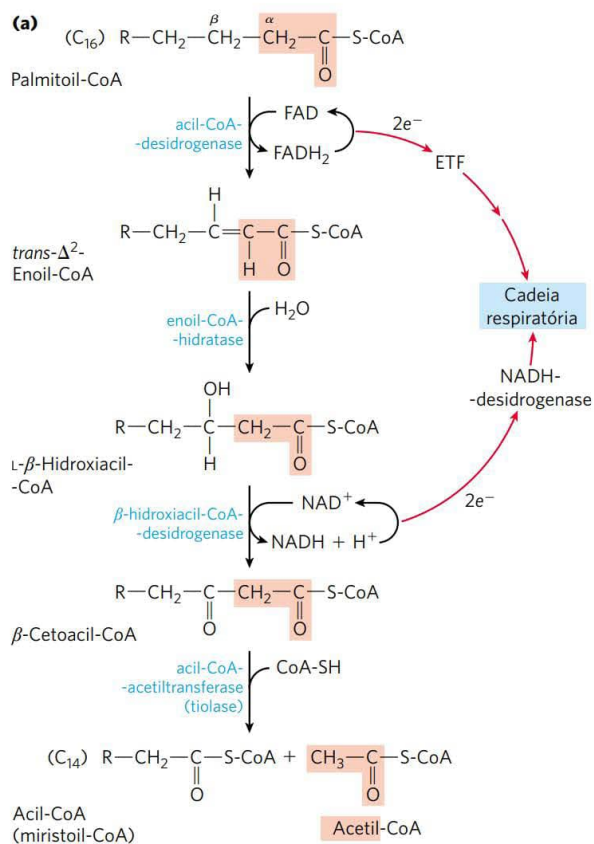


FIGURA 17-8 A via da β -oxidação. (a) Em cada passagem por essa sequência de quatro passos, um resíduo acetila (sombreado em cor salmão) é removido na forma de acetil-CoA da extremidade carboxílica da cadeia acila – nesse exemplo, o palmitato (C_{16}), que entra como palmitoil-CoA. Os elétrons da primeira oxidação passam através da flavoproteína ETF e, subsequentemente, através de uma segunda flavoproteína, para a cadeia respiratória. Os elétrons da segunda oxidação entram na cadeia respiratória por meio da NADH-desidrogenase (ver Figura 19-15). (b) Mais seis passagens pela via da β -oxidação produzem mais sete moléculas de acetil-CoA, a sétima vinda dos dois últimos átomos de carbono da cadeia de 16 carbonos. Oito moléculas de acetil-CoA são formadas no total. A acetil-CoA pode ser oxidada no ciclo do ácido cítrico, doando mais elétrons para a cadeia respiratória.

gações duplas nos ácidos graxos insaturados que ocorrem naturalmente com frequência estão na configuração *cis*. O significado dessa diferença será analisado mais tarde.

Esse primeiro passo é catalisado por três isoenzimas da **acil-CoA-desidrogenase**, cada uma específica para determinados comprimentos de cadeia acila: acil-CoA-desidrogenase de cadeia muito longa (VLCAD, do inglês, *very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase*), atuando em ácidos graxos de 12 a 18 carbonos; de cadeia média (MCAD, do inglês, *medium-chain acyl-chain acyl-CoA dehydrogenase*), atuando em ácidos graxos de 4 a 14 carbonos; e de cadeia curta (SCAD, do inglês, *short-chain acyl-CoA dehydrogenase*), atuando em ácidos graxos de 4 a 8 carbonos. A VLCAD localiza-se na membrana mitocondrial interna; MCAD e SCAD localizam-se na matriz. As três isoenzimas são flavoproteínas com FAD fortemente ligado (ver Figura 13-27) como grupo prostético. Os elétrons removidos da acil-CoA são transferidos para o FAD, e a forma reduzida da desidrogenase imediatamente doa seus elétrons a um transportador de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial, a **flavoproteína de transferência de elétrons (ETF)** (do inglês, *electron-transferring protein*) (ver Figura 19-15). A oxidação catalisada por uma acil-CoA-desidrogenase é análoga à desidrogenação do succinato no ciclo do ácido cítrico (p. 632); em ambas as reações, a enzima está ligada à membrana interna, uma ligação dupla é introduzida em um ácido carboxílico entre os carbonos α e β , FAD é o aceptor de elétrons, e os elétrons das reações por fim entram na cadeia respiratória e passam para o O_2 , com a síntese concomitante de cerca de 1,5 molécula de ATP por par de elétrons.

No segundo passo do ciclo da β -oxidação (Figura 17-8a), água é adicionada à ligação dupla da *trans*- Δ^2 -enoi-CoA, formando o estereoisômero L da **β -hidroxiacil-CoA (3-hidroxiacil-CoA)**. Essa reação, catalisada pela **enoi-CoA-hidratase**, é análoga à reação da fumarase no ciclo do ácido cítrico, no qual H_2O é adicionada a uma ligação dupla α - β (p. 633).

No terceiro passo, L- β -hidroxiacil-CoA é desidrogenada para formar **β -cetoacil-CoA**, pela ação da **β -hidroxiacil-CoA-desidrogenase**; NAD^+ é o aceptor de elétrons. Essa enzima é específica para o estereoisômero L da hidroxiacil-CoA. O NADH formado na reação doa seus elétrons para a **NADH-desidrogenase**, um transportador de elétrons da cadeia respiratória, e ATP é formado a partir de ADP à medida que os elétrons passam para o O_2 . A reação catalisada pela β -hidroxiacil-CoA-desidrogenase é análoga à reação da malato-desidrogenase do ciclo do ácido cítrico (p. 633).

O quarto e último passo do ciclo da β -oxidação é catalisado pela **acil-CoA-acetiltransferase**, mais comumente chamada de **tiolase**, que promove a reação da β -cetoacil-CoA com uma molécula de coenzima A livre para separar o fragmento de dois carbonos da extremidade carboxílica do ácido graxo original como acetil-CoA. O outro produto é o tioéster de coenzima A do ácido graxo, agora encurtado em dois átomos de carbono (Figura 17-8a). Essa reação é chamada de **tiólise**, por analogia ao processo de hidrólise, já que a β -cetoacil-CoA é clivada pela reação com o grupo tiol da coenzima A. A reação da tiolase é o reverso da condensação de Claisen (ver Figura 13-4).

As três últimas etapas dessa sequência de quatro passos são catalisadas por dois conjuntos de enzimas, sendo

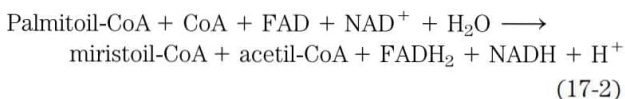
que as enzimas utilizadas dependerão do comprimento da cadeia da acila. Para cadeias com 12 carbonos ou mais, as reações são catalisadas por um complexo multienzimático associado à membrana interna da mitocôndria, a **proteína trifuncional (TFP)**. A TFP é um hetero-octâmero de subunidades $\alpha_4\beta_4$. Cada subunidade α possui duas atividades, a enoi-CoA-hidratase e a β -hidroxiacil-CoA-desidrogenase; as subunidades β possuem atividade de tiolase. Essa associação íntima de três enzimas pode permitir uma canalização eficiente do substrato de um sítio ativo para outro, sem a difusão dos intermediários para longe da superfície enzimática. Quando a TFP tiver encurtado a cadeia acila para 12 carbonos ou menos, as próximas oxidações são catalisadas por um conjunto de quatro enzimas solúveis na matriz.

Como salientado anteriormente, a ligação simples entre grupos metileno ($-\text{CH}_2-$) nos ácidos graxos é relativamente estável. A sequência da β -oxidação é um mecanismo elegante para desestabilizar e quebrar essas ligações. As três primeiras reações da β -oxidação criam uma ligação C—C muito menos estável, na qual o carbono α (C-2) está ligado a dois carbonos carbonílicos (o intermediário β -cetoacil-CoA). A função cetona do carbono β (C-3) faz dele um bom alvo para ataque nucleofílico pelo $-\text{SH}$ da coenzima A, catalisado pela tiolase. A acidez do hidrogênio α e a estabilização por ressonância do carbânion gerado pela saída desse hidrogênio tornam o grupo terminal $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{S-CoA}$ um bom grupo de saída, facilitando a quebra da ligação α - β .

Já foi vista uma sequência de reações praticamente idênticas a essas quatro etapas da oxidação dos ácidos graxos, nas etapas de reação do ciclo do ácido cítrico entre succinato e oxalacetato (ver Figura 16-7). Uma sequência de reação praticamente idêntica ocorre também nas vias pelas quais os aminoácidos de cadeia lateral ramificada (isoleucina, leucina e valina) são oxidados como combustíveis (ver Figura 18-28). A **Figura 17-9** mostra as características comuns dessas três sequências, quase certamente um exemplo da conservação de um mecanismo por duplicação gênica e evolução de uma nova especificidade nos produtos enzimáticos dos genes duplicados.

Os quatro passos da β -oxidação são repetidos para produzir acetil-CoA e ATP

Em uma passagem pela sequência da β -oxidação, uma molécula de acetil-CoA, dois pares de elétrons e quatro prótons (H^+) são removidos da acil-CoA graxa de cadeia longa, encurtando-a em dois átomos de carbono. A equação para uma passagem, iniciando com o éster da coenzima A do exemplo, palmitato, é



Seguindo a remoção de uma unidade de acetil-CoA da palmitoil-CoA, resta o tioéster de coenzima A do ácido graxo encurtado (agora o miristato, com 14 carbonos). A miristoil-CoA pode agora passar por outro conjunto de quatro reações da β -oxidação, exatamente análogo ao primeiro, para produzir outra molécula de acetil-CoA e lauroil-CoA, o tioéster de coenzima A do laurato de 12 carbonos. Ao todo,

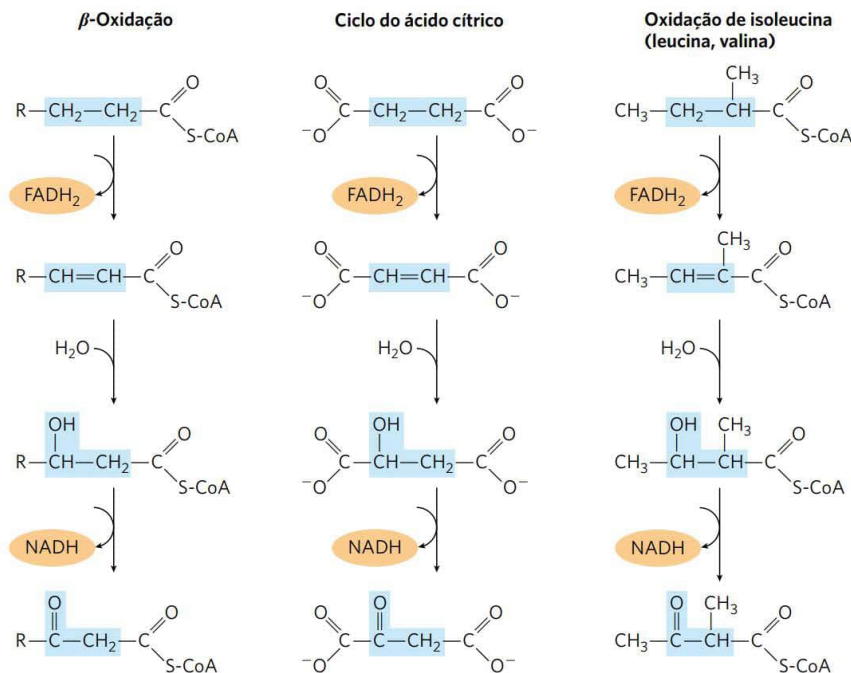
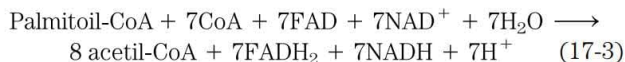


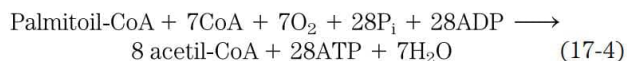
FIGURA 17-9 A sequência de reações conservadas para introduzir uma função carbonila no carbono β e formar uma carboxila. A via de β -oxidação para formar acil-CoA graxa, a via de succinato a oxalacetato no ciclo do ácido cítrico e a via pelo qual os esqueletos de carbonos desaminados da isoleucina, da leucina e da valina são oxidados como combustíveis usam todas as mesmas sequências de reações.

sete passagens pela sequência da β -oxidação são necessárias para oxidar uma molécula de palmitoil-CoA em oito moléculas de acetil-CoA (Figura 17-8b). A equação global é



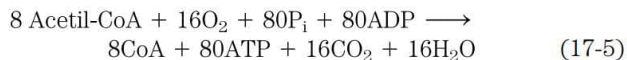
Cada molécula de FADH_2 formada durante a oxidação do ácido graxo doa um par de elétrons para a ETF da cadeia respiratória, e cerca de 1,5 molécula de ATP é gerada durante a transferência de cada par de elétrons para o O_2 . Do mesmo modo, cada molécula de NADH formada doa um par de elétrons para a NADH-desidrogenase mitocondrial, e a transferência subsequente de cada par de elétrons para o O_2 resulta na formação de aproximadamente 2,5 moléculas de ATP. Assim, quatro moléculas de ATP são formadas para cada unidade de dois carbonos removida em uma passagem pela sequência. Observe que água também é produzida nesse processo. A transferência de elétrons do NADH ou FADH_2 para o O_2 produz uma molécula de H_2O por par de elétrons, que é referida como “água metabólica”. A redução do O_2 pelo NADH também consome um H^+ por molécula de NADH: $\text{NADH} + \text{H}^+ + \frac{1}{2}\text{O}_2 \longrightarrow \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$. Em animais hibernantes, a oxidação de ácidos graxos fornece energia metabólica, calor e água – todos essenciais para a sobrevivência de um animal que não come nem bebe por longos períodos (Quadro 17-1). Os camelos obtêm água para suplementar o escasso suprimento disponível no seu ambiente natural pela oxidação de gorduras armazenadas em suas corcovas.

A equação total para a oxidação da palmitoil-CoA em oito moléculas de acetil-CoA, incluindo as transferências de elétrons e as fosforilações oxidativas, é

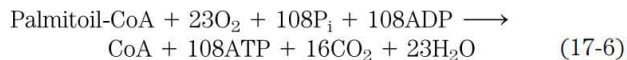


A acetil-CoA pode ser ainda mais oxidada no ciclo do ácido cítrico

A acetil-CoA produzida a partir da oxidação dos ácidos graxos pode ser oxidada a CO_2 e H_2O pelo ciclo do ácido cítrico. A equação a seguir representa o balancete para a segunda etapa da oxidação da palmitoil-CoA, junto com as fosforilações acopladas da terceira etapa:



Combinando as Equações 17-4 e 17-5, obtém-se a equação total para a oxidação completa da palmitoil-CoA em dióxido de carbono e água:



A Tabela 17-1 resume a formação de NADH, FADH_2 e ATP nos passos sucessivos da oxidação da palmitoil-CoA. Observe que, como a ativação do palmitato a palmitoil-CoA quebra duas ligações fosfoanidrido do ATP (Figura 17-5), o custo energético de ativar um ácido graxo é equivalente a 2 ATP e o ganho líquido por molécula de palmitato é de 106 ATP. A variação da energia livre padrão para a oxidação do palmitato a CO_2 e H_2O é aproximadamente 9.800 kJ/mol. Sob condições-padrão, a energia recuperada na forma de energia química da ligação fosfato do ATP é $106 \times 30,5 \text{ kJ/mol} = 3.230 \text{ kJ/mol}$, cerca de 33% do máximo teórico. Entretanto,

QUADRO 17-1 Uma longa soneca no inverno: oxidando gorduras durante a hibernação

Muitos animais dependem da gordura armazenada para obter energia durante a hibernação, em períodos migratórios e em outras situações envolvendo ajustes metabólicos radicais. Um dos ajustes mais pronunciados do metabolismo de gorduras ocorre nos ursos-pardos em hibernação. Esses animais permanecem em estado contínuo de dormência por períodos de até sete meses. Diferentemente da maioria das espécies hibernantes, o urso mantém uma temperatura corporal de aproximadamente 31°C, próxima ao nível normal (não hibernando), de cerca de 40°C. Embora gaste aproximadamente 25.000 kJ/dia (6.000 kcal/dia) enquanto em hibernação, o urso não come, não bebe, nem urina ou defeca por meses seguidos. Sua frequência cardíaca cai de 90 para 8 batidas por minuto, e a frequência respiratória cai de 6 a 10 para aproximadamente 1 inspiração por minuto. Como veremos no Capítulo 19, a transferência de elétrons mitocondrial pode ser desacoplada da produção de ATP, de modo que toda a energia da oxidação de combustível pode ser dissipada como calor, de modo a manter a temperatura corporal próxima ao normal frente a temperaturas ambientais bem menores.

Estudos experimentais mostraram que os ursos-pardos em hibernação utilizam a gordura corporal como seu único combustível. A oxidação das gorduras produz energia suficiente para manter a temperatura corporal, a síntese ativa de aminoácidos e proteínas e outras atividades que requerem energia, como o transporte através de membranas. A oxidação das gorduras também libera grandes quantidades de água, como descrito no texto, que repõem a água perdida na respiração. O glicerol liberado pela degradação dos triacilgliceróis é convertido em glicose sanguínea pela gliconeogênese. A ureia formada durante a degradação de aminoácidos é reabsorvida nos rins e reciclada, e os grupos amino são reutilizados para produzir novos aminoácidos para manter as proteínas corporais.

Os ursos armazenam uma enorme quantidade de gordura corporal quando em preparação para o seu longo sono. Um urso-pardo adulto consome cerca de 38.000 kJ/dia durante o final da primavera e o verão, porém, à medida que o inverno se aproxima, ele se alimenta durante 20 horas por dia, consumindo até 84.000 kJ/dia. Essa mudança na alimentação é uma resposta a uma mudança sazonal na secreção de hormônios. Grandes quantidades de triacilgliceróis são formadas a partir da grande ingestão de carboidratos durante o período de engorda. Ao emergir da hibernação, o urso terá perdido 15 a 40% de sua massa corporal máxima.

O sono dos ursos no inverno é algumas vezes chamado de torpor, e difere em alguns pontos importantes do comportamento de hibernação de um grupo de animais menores que passam por períodos alternados de temperatura corporal alta e baixa. Nesses animais, a temperatura corporal aproxima-se da temperatura ambiente, próxima de 0°C, durante boa parte do período de hibernação, mas eleva-se, alcançando níveis próximos da fase de pré-hibernação durante os breves períodos de vigília. Durante esses períodos, os animais alimentam-se, bebem e defecam. No esquilo do Ártico (*Urocyon parryi*), por exemplo, a temperatura corporal (37°C antes da hibernação) cai para 0°C durante a hibernação, e a frequência respiratória cai para menos de 10% de seu nível pré-hibernação.

Estudos dos mecanismos da hibernação podem fornecer vislumbres para a solução de diversos problemas da medicina humana; por exemplo, a redução do metabolismo de órgãos doados para transplante poderia aumentar seu período de viabilidade. Além disso, se a humanidade fizer longas viagens no espaço, a indução de um estado semelhante ao torpor pode reduzir a monotonia em missões longas, além de conservar recursos de bordo, como alimento e oxigênio.



Um urso-pardo prepara seu ninho para hibernação próximo ao Rio McNeil, no Canadá.
[Fonte: Stouffer Productions/Animals Animals.]

TABELA 17-1 Produção de ATP durante a oxidação de uma molécula de palmitoil-CoA a CO₂ e H₂O

Enzima que catalisa o passo de oxidação	Quantidade de NADH ou FADH ₂ formados	Quantidade de ATP formado no final ^a
<i>β</i>-Oxidação		
Acil-CoA-desidrogenase	7 FADH ₂	10,5
<i>β</i> -Hidroxiacil-CoA-desidrogenase	7 NADH	17,5
Ciclo do ácido cítrico		
Isocitrato-desidrogenase	8 NADH	20
<i>α</i> -Cetoglutarato-desidrogenase	8 NADH	20
Succinil-CoA-sintetase		8 ^b
Succinato-desidrogenase	8 FADH ₂	12
Malato-desidrogenase	8 NADH	20
Total		108

^aEsses cálculos pressupõem que a fosforilação oxidativa mitocondrial produz 1,5 ATP por FADH₂ oxidado e 2,5 ATP por NADH oxidado.

^bO GTP produzido diretamente nesse passo gera ATP na reação catalisada pela nucleosídeo-difosfato-cinase (p. 516).

quando as mudanças de energia livre são calculadas a partir das concentrações reais de reagentes e produtos nas condições intracelulares (ver Problema 13-2, p. 509), a recuperação de energia livre é maior que 60%; a conservação de energia é notavelmente eficiente.

A oxidação de ácidos graxos insaturados requer duas reações adicionais

A sequência descrita de oxidação dos ácidos graxos é típica quando o ácido graxo é saturado (i.e., tem apenas ligações simples na sua cadeia de carbonos). Entretanto, a maioria dos ácidos graxos nos triacilgliceróis e nos fosfolípidos de animais e plantas é insaturada, tendo uma ou mais ligações duplas. Essas ligações estão na configuração *cis* e não podem sofrer a ação da enoil-CoA-hidratase, a enzima que catalisa a adição de H₂O às ligações duplas *trans* da Δ^2 -enoil-CoA gerada durante a *β*-oxidação. Duas enzimas auxiliares são necessárias para a *β*-oxidação dos ácidos graxos insaturados comuns: uma isomerase e uma redutase. Essas reações auxiliares podem ser ilustradas com dois exemplos.

O oleato é um ácido graxo abundante monoinsaturado com 18 átomos de carbono e com uma ligação dupla *cis* entre C-9 e C-10 (simbolizada por Δ^9). No primeiro passo de oxidação, o oleato é convertido a oleoil-CoA e, como os ácidos graxos saturados, entra na matriz mitocondrial pela lançadeira da carnitina (Figura 17-6). A oleoil-CoA, então, passa três vezes pelo ciclo de oxidação dos ácidos graxos para produzir três moléculas de acetil-CoA e o éster de coenzima A de um ácido graxo insaturado de 12 átomos de carbono Δ^3 , a *cis*- Δ^3 -dodecenil-CoA (Figura 17-10). Esse produto não pode servir de substrato para a enoil-CoA-hidratase, que atua apenas em ligações duplas *trans*. A enzima auxiliar Δ^3, Δ^2 -enoil-CoA-isomerase isomeriza a *cis*- Δ^3 -enoil-CoA a *trans*- Δ^2 -enoil-CoA, que é convertida pela enoil-CoA-hidratase a L-*β*-hidroxiacil-CoA correspondente (*trans*- Δ^2 -dodecenil-CoA). Esse intermediário, então, sofre a ação das enzimas restantes da *β*-oxidação para produzir acetil-CoA e o éster de coenzima A de um ácido graxo saturado

de 10 carbonos, o decanoil-CoA. Esse último sofre quatro passagens pela via de *β*-oxidação para produzir mais cinco moléculas de acetil-CoA. No total, nove acetil-CoA são produzidas a partir de uma molécula de oleato de 18 carbonos.

A outra enzima auxiliar (uma redutase) é necessária para a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados – por exemplo, o linoleato de 18 carbonos, que tem configuração *cis*- Δ^9, cis - Δ^{12} (Figura 17-11). A linoleoil-CoA sofre

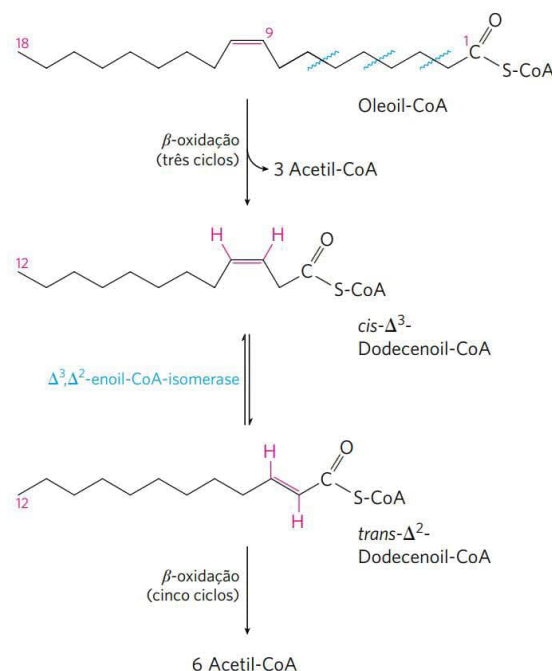


FIGURA 17-10 Oxidação de um ácido graxo monoinsaturado. O ácido oleico, como oleoil-CoA (Δ^9), é o exemplo utilizado aqui. A oxidação requer uma enzima adicional, enoil-CoA-isomerase, para reposicionar a ligação dupla, convertendo o isômero *cis* em um isômero *trans*, um intermediário normal na *β*-oxidação.

três passagens pela sequência de β -oxidação para produzir três moléculas de acetil-CoA e o éster de coenzima A de um ácido graxo insaturado de 12 carbonos com uma configuração *cis*- Δ^3 , *cis*- Δ^6 . Esse intermediário não pode ser utilizado pelas enzimas da via da β -oxidação; suas ligações duplas estão na posição errada e possuem uma configuração errada (*cis*, não *trans*). Entretanto, a ação combinada da enoil-CoA-isomerase e da **2,4-dienoil-CoA-redutase**, como mostrado na Figura 17-11, permite a reentrada desse intermediário na via da β -oxidação e a sua degradação a 6 acetil-CoA. O resultado global é a conversão de linoleato a nove moléculas de acetil-CoA.

A oxidação completa de ácidos graxos de número ímpar requer três reações extras

Embora a maioria dos lipídeos de ocorrência natural contenha ácidos graxos com um número par de átomos de

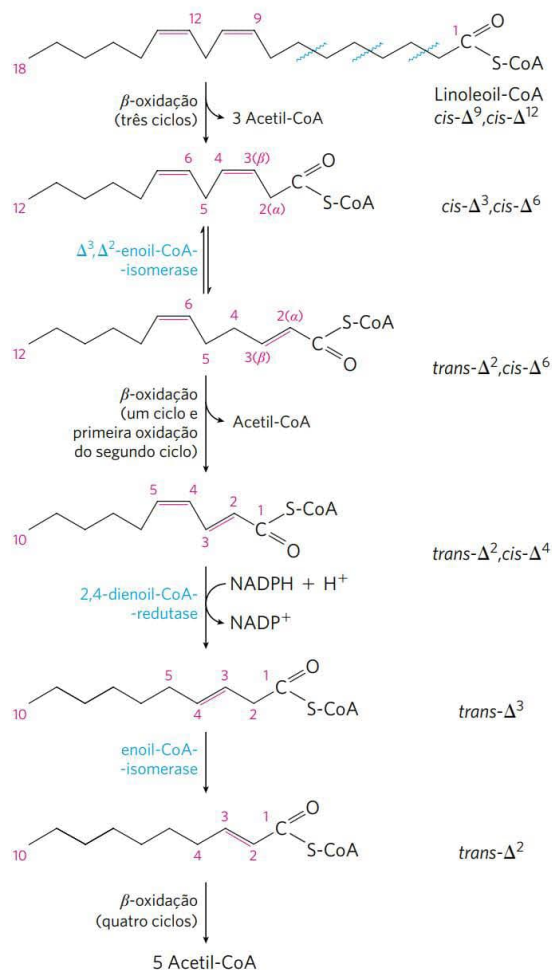


FIGURA 17-11 Oxidação de um ácido graxo poli-insaturado. O exemplo aqui é o ácido linoleico, como linoleoil-CoA ($\Delta^{3,12}$). A oxidação requer uma segunda enzima auxiliar além da enoil-CoA-isomerase: a 2,4-dienoil-CoA-redutase dependente de NADPH. A ação combinada dessas duas enzimas converte um intermediário $\text{trans-}\Delta^2, \text{cis-}\Delta^4$ -dienoil-CoA ao substrato $\text{trans-}\Delta^2$ -enoil-CoA necessário para a β -oxidação.

carbono, os ácidos graxos com um número ímpar de carbonos são comuns nos lipídeos de muitas plantas e de alguns organismos marinhos. O gado e outros animais ruminantes formam grandes quantidades de **propionato** de três carbonos ($\text{CH}_3\text{—CH}_2\text{—COO}^-$) durante a fermentação dos carboidratos no rúmen. O propionato é absorvido pelo sangue e oxidado pelo fígado e por outros tecidos.

Os ácidos graxos de cadeia longa de número ímpar de carbonos são oxidados na mesma via que os ácidos de número par, iniciando na extremidade carboxila da cadeia. Entretanto, o substrato para a última passagem pela sequência de β -oxidação é uma acil-CoA com um ácido de cinco carbonos. Quando esse ácido é oxidado e clivado, os produtos são acetil-CoA e **propionil-CoA**. A acetil-CoA pode ser oxidada no ciclo do ácido cítrico, é claro, mas a propionil-CoA entra em uma via diferente, contendo três enzimas.

A propionil-CoA é primeiro carboxilada para formar o estereoisômero D da **metilmalonil-CoA** (Figura 17-12) pela **propionil-CoA-carboxilase**, que contém biotina como cofator. Nessa reação enzimática, como na reação da piruvato-carboxilase (ver Figura 16-17), o CO_2 (ou seu

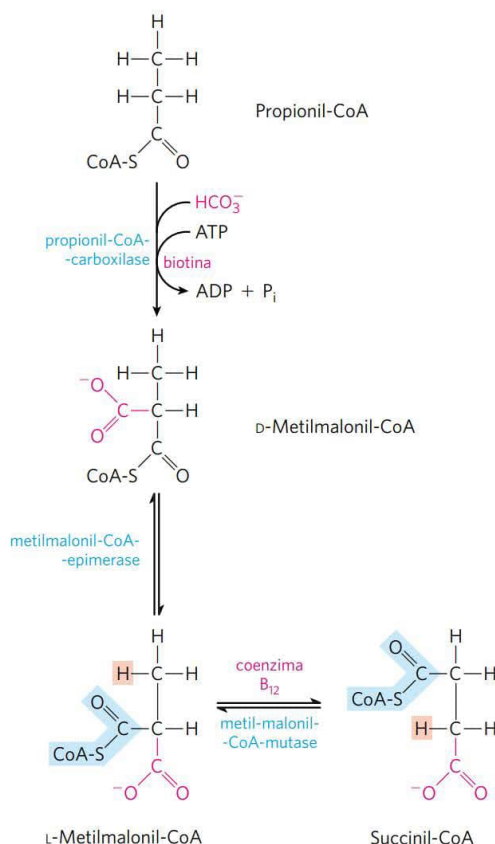


FIGURA 17-12 Oxidação da propionil-CoA produzida pela β -oxidação de ácidos graxos de número ímpar de carbonos. A sequência envolve a carboxilação da propionil-CoA em D-metilmalonil-CoA e a conversão dessa última em succinil-CoA. Esta conversão requer a epimerização de D a L-metilmalonil-CoA, seguida por uma reação notável, na qual os substituintes em átomos de carbono adjacentes trocam de posição (ver Quadro 17-2).

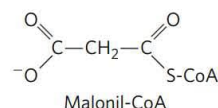
ion hidratado, HCO_3^-) é ativado pela ligação à biotina antes de sua transferência para o substrato, nesse caso a porção propionato. A formação do intermediário carboxibiotina requer energia, que é fornecida pelo ATP. A D-metilmalonil-CoA assim formada é enzimaticamente epimerizada ao seu estereoisômero L pela **metilmalonil-CoA-epimerase** (Figura 17-12). A L-metilmalonil-CoA, então, sofre um rearranjo intramolecular para formar succinil-CoA, que pode entrar no ciclo do ácido cítrico. Esse rearranjo é catalisado pela **metilmalonil-CoA-mutase**, que requer como coenzima **5'-desoxiadenosilcobalamina**, ou **coenzima B₁₂**, que é derivada da vitamina B₁₂ (cobalamina). O Quadro 17-2 descreve o papel da coenzima B₁₂ nessa notável reação de troca.

A oxidação dos ácidos graxos é estritamente regulada

A oxidação dos ácidos graxos consome um combustível precioso e é regulada de forma que ocorra apenas quando houver a necessidade de energia. No fígado, a acil-CoA formada no citosol a partir de ácidos graxos tem duas vias principais abertas: (1) β -oxidação por enzimas na mitocôndria ou (2) conversão em triacilgliceróis e fosfolípidos por enzimas no citosol. A via tomada depende da taxa de transferência de acil-CoA de cadeia longa para dentro da mitocôndria. O processo de três passos (lançadeira da carnitina) pelo qual os grupos acil-CoA de cadeia longa são carregados da acil-CoA citosólica para a matriz mitocondrial (Figura 17-6) é o passo limitante para a oxidação de ácidos graxos, sendo um ponto de regulação importante.

Uma vez que os grupos acila entram na mitocôndria, eles estão destinados à oxidação em acetil-CoA.

A **malonil-CoA**, o primeiro intermediário na biossíntese citosólica de ácidos graxos de cadeia longa a partir da acetil-CoA (ver Figura 21-2), tem sua concentração aumentada quando o animal está bem suprido de carboidratos; o excesso de glicose, que não pode ser oxidado ou armazenado como glicogênio, é convertido em ácidos graxos no citosol, para armazenamento como triacilglicerol. A inibição da carnitina-aciltransferase 1 pela malonil-CoA (**Figura 17-13**) garante que a oxidação de ácidos graxos seja inibida quando o fígado está amplamente suprido de glicose como combustível e está produzindo triacilgliceróis a partir do excesso de glicose.



Duas das enzimas da β -oxidação também são reguladas por metabólitos que sinalizam a suficiência de energia. Quando a razão $[\text{NADH}/\text{NAD}^+]$ é alta, a β -hidroxiacil-CoA-desidrogenase é inibida; além disso, altas concentrações de acetil-CoA inibem a tiolase.

Lembre-se, do Capítulo 15, que, durante períodos de contração muscular vigorosa ou durante o jejum, a queda na $[\text{ATP}]$ e o aumento da $[\text{AMP}]$ ativam a proteína-cinase ativada por AMP (AMPK, do inglês, *AMP-activated protein kinase*). A AMPK fosforila várias enzimas-alvo, incluindo

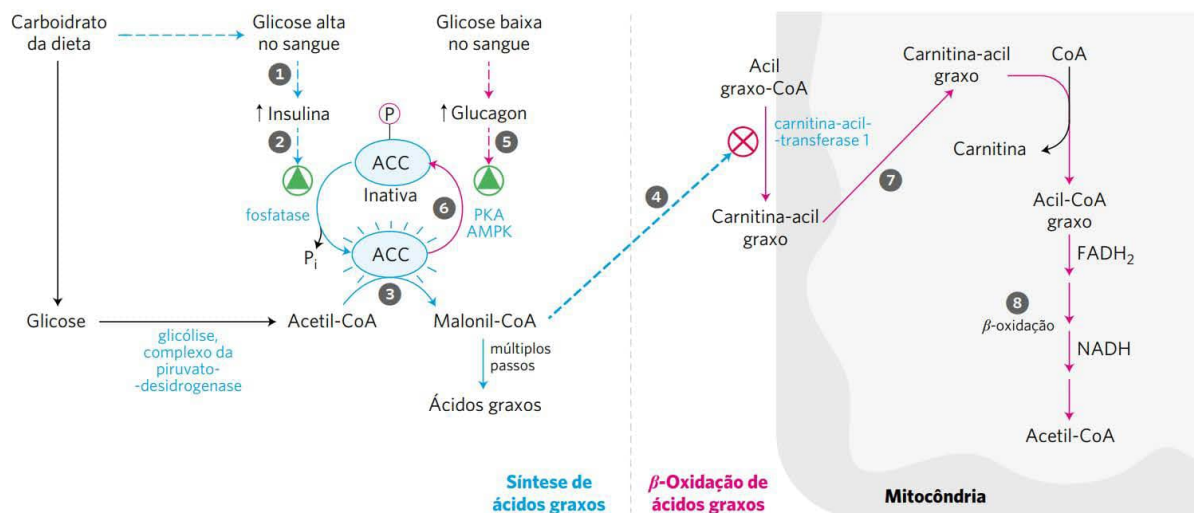


FIGURA 17-13 Regulação coordenada da síntese e da degradação dos ácidos graxos. Quando a dieta disponibiliza uma fonte imediata de carboidratos como combustível, a β -oxidação dos ácidos graxos é desnecessária, sendo, portanto, desativada. Duas enzimas são essenciais na coordenação do metabolismo dos ácidos graxos: a acetil-CoA-carboxilase (ACC), a primeira enzima na síntese dos ácidos graxos (ver Figura 21-1), e a carnitina-aciltransferase 1, que limita o transporte de ácidos graxos para dentro da matriz mitocondrial para a β -oxidação (ver Figura 17-6). A ingestão de uma refeição rica em carboidratos aumenta o nível de glicose no sangue e, portanto, **1** ativa a liberação de insulina. **2** A proteína-fosfatase dependente de insulina desfosforila a ACC, ativando-a. **3** A ACC catalisa a formação de malonil-CoA (o primeiro intermediário da síntese de ácidos graxos), que **4** inibe a carnitina-aciltransferase 1, impedindo, assim, a entrada de ácidos graxos na matriz mitocondrial. Quando baixam os níveis de glicose no sangue, entre as refeições, **5** a liberação de glucagon ativa a proteína-cinase dependente de cAMP (PKA), que **6** fosforila e inativa a ACC. Quando a $[\text{AMP}]$ aumenta, a AMPK também fosforila e inativa a ACC. Com a baixa concentração de malonil-CoA, a inibição da entrada de ácidos graxos na mitocôndria é aliviada, e **7** os ácidos graxos entram na matriz mitocondrial e **8** tornam-se o principal combustível. Como o glucagon também ativa a mobilização de ácidos graxos no tecido adiposo, um suprimento de ácidos graxos começa a chegar ao sangue.

QUADRO 17-2 Coenzima B₁₂: uma solução radical para um problema desconcertante

Na reação da metilmalonil-CoA-mutase (ver Figura 17-12), o grupo —CO—S-CoA no C-2 do propionato original troca de posição com um átomo de hidrogênio em C-3 do propionato original (Figura Q-1a). A coenzima B₁₂ é o cofator para essa reação, assim como para quase todas as enzimas que catalisam reações desse tipo (Figura Q-1b). Esses processos dependentes de coenzima B₁₂ estão entre as poucas reações enzimáticas biológicas em que existe a troca de um grupo alquila ou alquila substituído (X) por um átomo de hidrogênio em um carbono adjacente, *sem a mistura do átomo de hidrogênio transferido com o hidrogênio do solvente, H₂O*. Como pode o átomo de hidrogênio se mover entre dois carbonos sem se misturar com o enorme excesso de átomos de hidrogênio do solvente?

A coenzima B₁₂ é a forma cofator da vitamina B₁₂, que é singular entre todas as vitaminas por conter não apenas uma molécula orgânica complexa, mas também um elemento-traço essencial, o cobalto. O complexo **sistema de anel da corrina** da vitamina B₁₂ (colorido em azul na Figura Q-2), ao qual o cobalto (como Co³⁺) está coordenado, é quimicamente relacionado ao sistema de anéis da porfirina do heme e das hemoproteínas (ver Figura 5-1). Uma quinta posição de coordenação do cobalto está preenchida pelo ribonucleotídeo dimetilbenzimidazol (sombreado em amarelo), ligado covalentemente pelo seu grupo 3'-fosfato a uma cadeia lateral do anel corrina, através do aminoisopropanol. A formação desse cofator complexo ocorre em uma de apenas duas reações conhecidas em que o trifosfato do ATP é clivado (Figura Q-3); a outra reação é a formação de S-adenosilmetionina a partir de ATP e metionina (ver Figura 18-18).

A vitamina B₁₂ na forma em que geralmente é isolada é chamada de **cianocobalamina**, porque contém um grupo



Dorothy Crowfoot Hodgkin, 1910-1994
[Fonte: Bettmann/Corbis.]

grupo ciano (capturado durante a purificação) ligado ao cobalto na sexta posição de coordenação. Na **5'-desoxiadenosilcobalamina**, o cofator para a metilmalonil-CoA-mutase, o grupo ciano é substituído pelo grupo **5'-desoxiadenosil** (em vermelho na Figura Q-2), covalentemente ligado pelo C-5' ao cobalto. A estrutura tridimensional do cofator foi determinada por Dorothy Crowfoot Hodgkin, em 1956, por cristalografia por raios X.

A chave para entender como a coenzima B₁₂ catalisa a troca do hidrogênio está nas propriedades da ligação covalente entre o cobalto e o C-5' do grupo desoxiadenosila (Figura Q-2). Essa ligação é relativamente fraca; a mera iluminação do composto com luz visível é suficiente para quebrar a ligação Co—C. (Essa fotolabilidade extrema provavelmente é responsável pela ausência de vitamina B₁₂ nas plantas.) A dissociação produz um

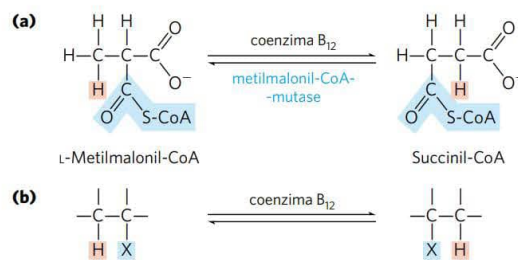


FIGURA Q-1

radical 5'-desoxiadenosila e a forma Co²⁺ da vitamina. A função química da 5'-desoxiadenosilcobalamina é gerar radicais livres, iniciando, dessa forma, uma série de transformações, como aquela ilustrada na Figura Q-4 – um mecanismo postulado para a reação catalisada pela metilmalonil-CoA-mutase e várias outras transformações dependentes de coenzimas B₁₂. Nesse mecanismo postulado, o átomo de hidrogênio que migra nunca existe como uma espécie livre e, conseqüentemente, nunca está livre para ser trocado com o hidrogênio de moléculas de água no ambiente.

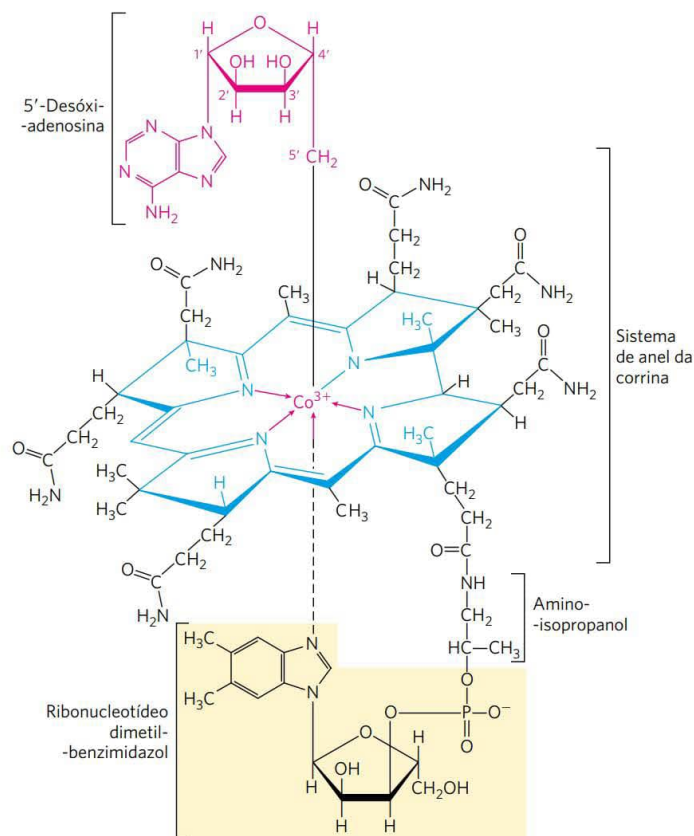


FIGURA Q-2

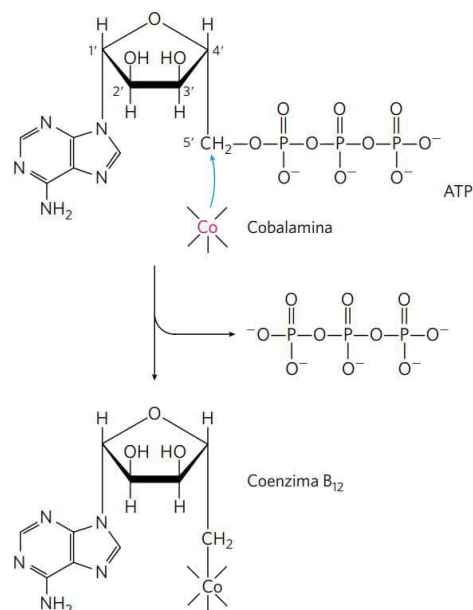
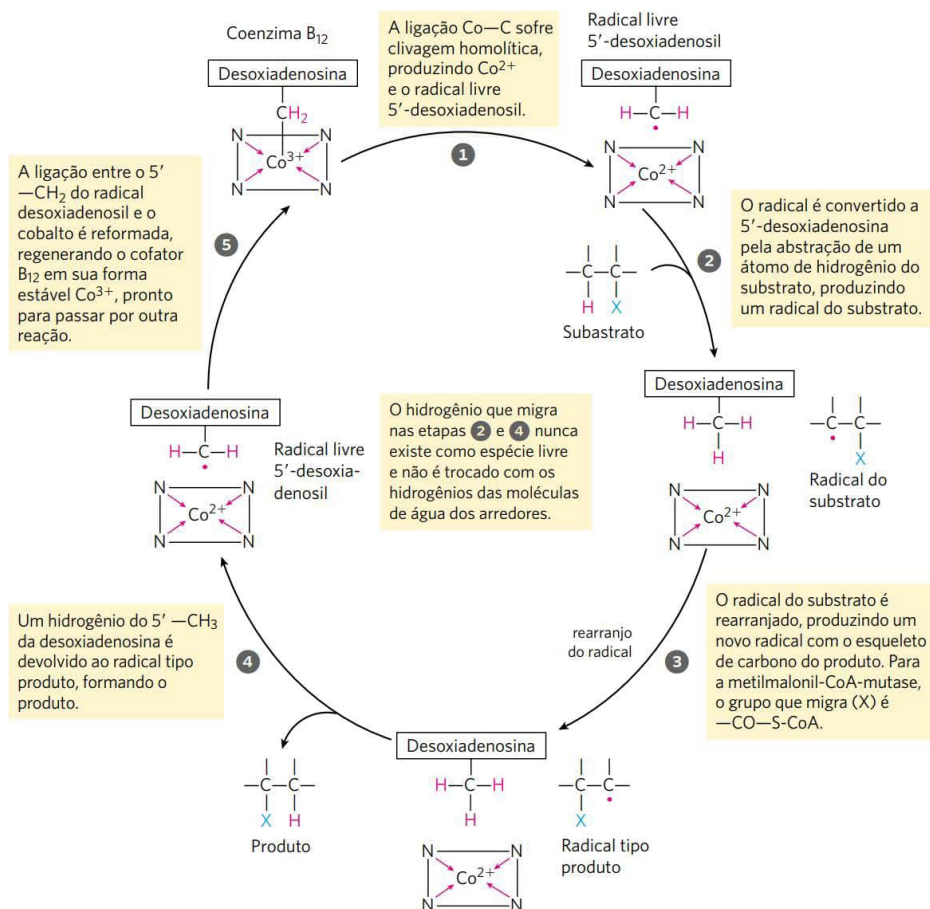


FIGURA Q-3



A deficiência de vitamina B₁₂ resulta em doença grave. Essa vitamina não é sintetizada pelas plantas ou pelos animais e pode ser sintetizada apenas por poucas espécies de microrganismos. Ela é necessária para pessoas saudáveis apenas em quantidades pequenas, cerca de 3 µg/dia. A **anemia perniciosa**, uma doença grave, resulta da falha da absorção eficiente de vitamina B₁₂ pelo intestino, onde é sintetizada pelas bactérias intestinais ou obtida pela digestão da carne. Indivíduos com essa doença não produzem quantidades suficientes do **fator intrínseco**, uma glicoproteína essencial para a absorção da vitamina B₁₂. A patologia da anemia perniciosa inclui produção reduzida de eritrócitos, níveis reduzidos de hemoglobina e dano progressivo e grave do sistema nervoso central. A administração de altas doses de vitamina B₁₂ alivia esses sintomas em pelo menos alguns casos. ■



MECANISMO-FIGURA Q-4

a acetil-CoA-carboxilase, que catalisa a síntese de malonil-CoA. Essa fosforilação e, conseqüentemente, a inibição da acetil-CoA-carboxilase diminuem a concentração de malonil-CoA, aliviando a inibição do transporte de acil-carnitina para a mitocôndria (Figura 17-13) e permitindo que a β -oxidação reabasteça o suprimento de ATP.

Fatores de transcrição ativam a síntese de proteínas para o catabolismo de lipídeos

Além dos vários mecanismos regulatórios de curta duração que modulam a atividade de enzimas existentes, a regulação transcricional pode modificar o número de moléculas das enzimas da oxidação dos ácidos graxos em uma escala de tempo maior, de minutos a horas. A família de receptores nucleares **PPAR (receptor ativado por proliferadores de peroxissomos)** compreende fatores de transcrição que afetam muitos processos metabólicos em resposta a uma variedade de ligantes semelhantes aos ácidos graxos. (Eles foram originalmente identificados como receptores ativados por proliferadores de peroxissomos, porém, posteriormente, observou-se que funcionam mais amplamente.) O PPAR α age no músculo, no tecido adiposo e no fígado para ativar um grupo de genes essenciais para a oxidação de ácidos graxos, incluindo o transportador de ácidos graxos, carnitina-aciltransferases 1 e 2, acil-CoA-desidrogenases para cadeias curtas, médias, longas e muito longas e enzimas relacionadas. Essa resposta é disparada quando uma célula ou organismo tem uma demanda aumentada por energia do catabolismo das gorduras, como durante o jejum entre as refeições ou sob condição de fome por longo período. O glucagon, liberado em resposta à baixa concentração de glicose no sangue, pode agir por meio do cAMP e do fator de transcrição CREB para ativar certos genes para o catabolismo de lipídeos.

Outra situação acompanhada por grandes mudanças na expressão das enzimas da oxidação dos ácidos graxos é a transição do metabolismo fetal para o neonatal no coração. No feto, os combustíveis principais para o músculo cardíaco são glicose e lactato, porém, no coração do neonato, os ácidos graxos são o principal combustível. No momento dessa transição, o PPAR α é ativado, e, por sua vez, ativa os genes essenciais para o metabolismo dos ácidos graxos. Como será visto no Capítulo 23, dois outros fatores de transcrição da família PPAR também desempenham papéis cruciais no ajuste dos complementos das enzimas – e conseqüentemente, das atividades metabólicas – de tecidos específicos em períodos específicos (ver Figura 23-43).

Os principais locais de oxidação dos ácidos graxos, no descanso e durante o exercício, são os músculos esquelético e cardíaco. O treino para exercícios de resistência aumenta a expressão de PPAR α no músculo, levando a níveis elevados das enzimas de oxidação dos ácidos graxos e ao aumento da capacidade oxidativa do músculo.

Defeitos genéticos nas acil-CoA-desidrogenases causam doenças graves



Os triacilgliceróis estocados são geralmente as principais fontes de energia para a contração mus-

cular, e a incapacidade de oxidar ácidos graxos a partir de triacilgliceróis tem sérias conseqüências para a saúde. O defeito genético mais comum no catabolismo de ácidos graxos nos Estados Unidos e em populações do norte da Europa é devido a uma mutação no gene que codifica a **acil-CoA-desidrogenase de cadeia média (MCAD)**, mencionada anteriormente neste Capítulo. Entre os europeus setentrionais, a frequência de portadores (indivíduos com essa mutação recessiva em um dos dois cromossomos homólogos) é cerca de 1 em 40, e cerca de 1 indivíduo em 10.000 tem a doença – ou seja, tem duas cópias do alelo de MCAD mutante e é incapaz de oxidar ácidos graxos de 6 a 12 átomos de carbono. A doença é caracterizada por episódios recorrentes de uma síndrome que inclui acúmulo de gordura no fígado, altos níveis sanguíneos de ácido octa-noico (8:0), baixo nível de glicose no sangue (hipoglicemia), sonolência, vômito e coma. Embora os indivíduos possam não apresentar sintomas entre os episódios, esses são muito graves; a mortalidade devida a essa doença é de 25 a 60% na primeira infância. Se o defeito genético for detectado logo após o nascimento, o recém-nascido pode receber uma dieta pobre em gordura e rica em carboidratos. Com a detecção precoce e uma gestão cuidadosa da dieta – inclusive evitando intervalos longos entre as refeições, para prevenir que o corpo mobilize suas reservas de gordura para obter energia –, o prognóstico para esses indivíduos é bom.

Para triagem de recém-nascidos buscando detectar possíveis defeitos metabólicos da oxidação dos ácidos graxos, são determinados os níveis plasmáticos de acil-carnitina em uma pequena amostra de sangue. Quando há uma falha na oxidação de ácidos graxos, ocorre acúmulo de acil-carnitina na mitocôndria, que, então, é carregada para o citosol e daí para o sangue, onde pode ser detectada por espectrometria de massa em tandem (p. 101).

Mais de 20 outros defeitos genéticos em seres humanos para o transporte ou a oxidação de ácidos graxos foram documentados, a maioria muito menos comum que o defeito na MCAD. Um dos distúrbios mais graves resulta da perda da atividade da β -hidroxiacil-CoA-desidrogenase de cadeia longa da proteína trifuncional, TFP. Outros distúrbios incluem defeitos nas subunidades α ou β que afetam todas as três atividades da TFP e causam doenças cardíacas graves e músculo esquelético anormal. ■

Os peroxissomos também realizam β -oxidação

A matriz mitocondrial é o principal local de oxidação de ácidos graxos nas células animais, porém, em certas células, outros compartimentos também contêm as enzimas capazes de oxidar ácidos graxos a acetil-CoA, por uma via semelhante, mas não idêntica àquela mitocondrial. Em células vegetais, o principal local da β -oxidação não é a mitocôndria, mas os peroxissomos.

Nos **peroxissomos**, organelas de células animais e vegetais, os intermediários para a β -oxidação dos ácidos graxos são derivados da coenzima A, e o processo consiste em quatro etapas, como na β -oxidação mitocondrial (**Figura 17-14**): (1) desidrogenação, (2) adição de água à ligação dupla resultante, (3) oxidação da β -hidroxiacil-CoA a uma

cetona e (4) clivagem tiolítica pela coenzima A. (As reações idênticas também ocorrem nos glioxissomos, organelas observadas apenas em sementes em germinação.)

Uma diferença entre as vias peroxissomal e mitocondrial está na química da primeira etapa (Figura 17-4). Nos peroxissomos, a flavoproteína acil-CoA-oxidase, que introduz a ligação dupla, passa os elétrons diretamente ao O_2 , produzindo H_2O_2 (daí o nome “peroxissomos”). Esse oxidante forte e potencialmente danoso é imediatamente clivado a H_2O e O_2 pela **catalase**. Lembre-se de que, na mitocôndria, os elétrons removidos na primeira etapa de oxidação passam pela cadeia respiratória até o O_2 para produzir H_2O e esse processo é acompanhado pela síntese de ATP. Nos peroxissomos, a energia liberada na primeira etapa oxidativa

da degradação dos ácidos graxos não é conservada como ATP, mas sim dissipada como calor.



Uma segunda diferença importante entre a β -oxidação mitocondrial e a peroxissomal em mamíferos está na especificidade para as acil-CoA; o sistema peroxissomal é muito mais ativo sobre ácidos graxos de cadeia muito longa, como o ácido hexacosanoico (26:0), e sobre ácidos graxos ramificados, como ácido fitânico e ácido pristânico (ver Figura 17-17). Esses ácidos graxos menos comuns são obtidos na dieta a partir de produtos lácteos, de gordura de animais ruminantes, carne e peixe. Seu catabolismo no peroxissomo envolve várias enzimas auxiliares exclusivas dessa organela. A incapacidade de oxidar esses compostos é responsável por várias doenças genéticas humanas graves. Indivíduos com a **síndrome de Zellweger** são incapazes de produzir peroxissomos e, consequentemente, não possuem todo metabolismo exclusivo dessa organela. Na **adrenoleucodistrofia ligada ao X (XALD)**, os peroxissomos falham em oxidar ácidos graxos de cadeia muito longa, aparentemente pela perda de um transportador funcional para esses ácidos graxos na membrana peroxissomal. Ambos os defeitos levam ao acúmulo no sangue de ácidos graxos de cadeia muito longa, especialmente 26:0. A XALD afeta meninos jovens com idade inferior a 10 anos, causando perda de visão, transtornos de comportamento e morte dentro de poucos anos. ■

Em mamíferos, altas concentrações de gorduras na dieta resultam em síntese aumentada das enzimas da β -oxidação peroxissomal no fígado. Os peroxissomos hepáticos não contêm as enzimas do ciclo do ácido cítrico e não podem catalisar a oxidação de acetil-CoA a CO_2 . Em vez disso, os ácidos graxos de cadeia longa ou ramificada são catabolizados a produtos de cadeia mais curta, como hexanoil-CoA, que são exportados para a mitocôndria e completamente oxidados. Como veremos no Capítulo 20, as sementes em germinação de plantas podem sintetizar carboidratos e muitos outros metabólitos a partir da acetil-CoA produzida nos peroxissomos, usando uma via (o ciclo do glioxilato) que não ocorre em vertebrados.

As enzimas da β -oxidação de organelas diferentes divergiram durante a evolução

Embora as reações da β -oxidação na mitocôndria sejam essencialmente as mesmas daquelas nos peroxissomos e nos glioxissomos, as enzimas (isoenzimas) diferem significativamente entre os dois tipos de organelas. As diferenças, aparentemente, refletem uma divergência evolutiva que ocorreu muito cedo, com a separação entre as bactérias gram-positivas e gram-negativas (ver Figura 1-7).

Na mitocôndria, as quatro enzimas da β -oxidação que atuam sobre acil-CoAs de cadeia curta são proteínas solúveis distintas (como descrito anteriormente), semelhantes em estrutura às enzimas análogas das bactérias gram-positivas (Figura 17-15a). As bactérias gram-negativas têm quatro atividades em três subunidades solúveis (Figura 17-15b), e o sistema enzimático eucariótico que atua sobre os ácidos graxos de cadeia longa – a proteína trifuncional, TFP – tem três atividades enzimáticas em duas subunida-

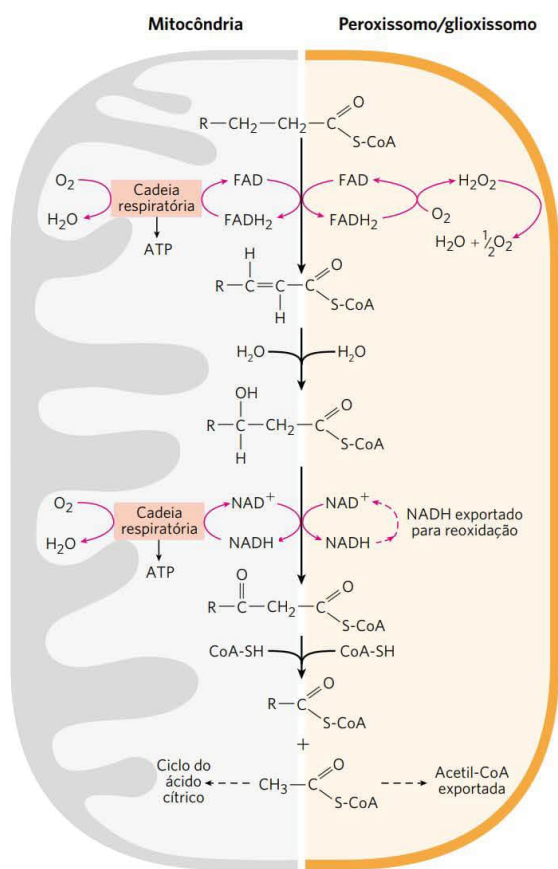
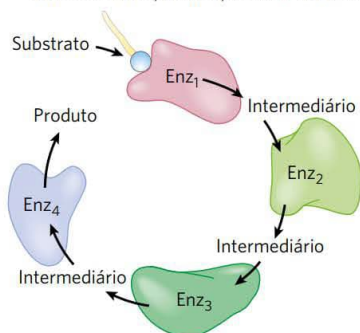
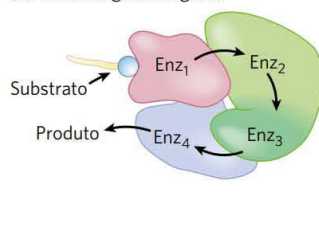
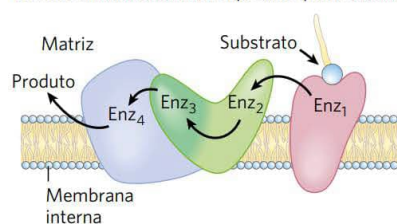
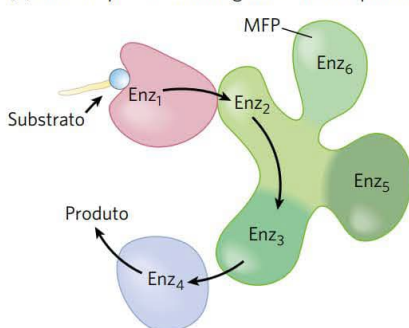


FIGURA 17-14 Comparação da β -oxidação na mitocôndria e nos peroxissomos e glioxissomos. O sistema que opera nos peroxissomos e nos glioxissomos difere do sistema mitocondrial em três aspectos: (1) o sistema peroxissomal prefere ácidos graxos de cadeia muito longa; (2) na primeira etapa oxidativa, os elétrons passam diretamente ao O_2 , gerando H_2O_2 ; e (3) o NADH formado na segunda etapa oxidativa não pode ser reoxidado nos peroxissomos ou nos glioxissomos, de modo que equivalentes redutores são exportados para o citosol e, por fim, alcançam a mitocôndria. A acetil-CoA produzida pelos peroxissomos e glioxissomos também é exportada; o acetato dos glioxissomos (organelas encontradas apenas nas sementes em germinação) serve como um precursor biossintético (ver Figura 20-55). A acetil-CoA produzida nas mitocôndrias é oxidada subsequentemente no ciclo do ácido cítrico.

(a) Bactéria gram-positiva e sistema mitocondrial específico para cadeia curta**(b)** Bactéria gram-negativa**(c)** Sistema mitocondrial específico para cadeia muito longa**(d)** Sistema peroxissomal e glioxissomal de plantas

Enz₁ Acil-CoA-desidrogenase
 Enz₂ Enoil-CoA-hidratase
 Enz₃ L-β-Hidroxiacil-CoA-desidrogenase
 Enz₄ Tiolase
 Enz₅ D-3-Hidroxiacil-CoA-epimerase
 Enz₆ Δ³, Δ²-Enoil-CoA-isomerase

FIGURA 17-15 As enzimas da β-oxidação. As diferentes estruturas das subunidades das enzimas da β-oxidação em bactérias gram-positivas e gram-negativas, mitocôndrias, peroxissomos e glioxissomos estão mostradas aqui. **(a)** As quatro enzimas da β-oxidação nas bactérias gram-positivas são entidades separadas e solúveis, como as do sistema específico para cadeias curtas das mitocôndrias. **(b)** Nas bactérias gram-negativas, as quatro atividades enzimáticas residem em três polipeptídeos; Enz₂ e Enz₃ são partes de uma única cadeia polipeptídica. **(c)** O sistema específico das mitocôndrias para cadeias muito longas também é composto por três polipeptídeos, um dos quais inclui as atividades da Enz₂ e da Enz₃; nesse caso, o sistema está ligado à membrana mitocondrial interna. **(d)** Nos sistemas de β-oxidação peroxissomal e glioxissomal, Enz₁ e Enz₄ são polipeptídeos separados, mas Enz₂ e Enz₃, bem como duas enzimas auxiliares (Enz₅ e Enz₆), são parte de uma única cadeia polipeptídica: a proteína multifuncional, MFP.

des que estão associadas à membrana (Figura 17-15c). As enzimas da β-oxidação dos peroxissomos e glioxissomos, no entanto, formam um complexo de proteínas, uma delas contendo quatro atividades enzimáticas em uma única cadeia polipeptídica (Figura 17-15d). A primeira enzima, a acil-CoA-oxidase, é uma cadeia polipeptídica única; a **proteína multifuncional (MFP)** contém a segunda e a terceira atividades enzimáticas (enoil-CoA-hidratase e hidroxiacil-CoA-desidrogenase), assim como duas atividades auxiliares necessárias para a oxidação dos ácidos graxos insaturados (D-3-hidroxiacil-CoA-epimerase e Δ³, Δ²-enoil-CoA-isomerase); a quarta enzima, a tiolase, é um polipeptídeo solúvel distinto.

As enzimas que catalisam essencialmente o inverso da β-oxidação, para a síntese dos ácidos graxos, também estão organizadas de forma diferente em bactérias e em eucariotos; nas bactérias, as sete enzimas necessárias para a síntese dos ácidos graxos são polipeptídeos distintos, já em mamíferos, todas as sete atividades fazem parte de uma única e enorme cadeia polipeptídica (ver Figura 21-3a). Uma vantagem para a célula em ter várias atividades enzimáticas da mesma via codificadas em uma única cadeia polipeptídica é solucionar o problema da regulação da síntese de enzimas que devem interagir funcionalmente; a regulação da expressão de um gene garante a produção do mesmo número de sítios ativos para todas as atividades enzimáticas da via. Quando cada atividade enzimática está em polipeptídeos distintos, algum mecanismo é necessário para coordenar a síntese de todos os produtos gênicos. A **desvantagem** de ter várias atividades no mesmo polipeptídeo é que quan-

to maior a cadeia polipeptídica maior é a probabilidade de um erro em sua síntese: um único aminoácido incorreto na cadeia pode tornar inúteis todas as atividades enzimáticas naquela cadeia. A comparação das estruturas gênicas para essas proteínas em muitas espécies pode esclarecer as razões para a seleção de uma ou outra estratégia durante a evolução.

A oxidação ω dos ácidos graxos ocorre no retículo endoplasmático

Embora a β-oxidação mitocondrial, na qual enzimas atuam na extremidade carboxila de um ácido graxo, seja o destino catabólico mais importante para os ácidos graxos nas células animais, existe outra via em algumas espécies, incluindo vertebrados, que envolve a oxidação do carbono ω (ômega) – o carbono mais distante do grupo carboxila. As enzimas exclusivas da ω-oxidação estão localizadas no retículo endoplasmático do fígado e dos rins, e os substratos preferidos são os ácidos graxos de 10 a 12 átomos de carbono. Em mamíferos a ω-oxidação é normalmente uma via minoritária para a degradação de ácidos graxos, mas quando a β-oxidação está defeituosa (p. ex., devido a uma mutação ou a uma deficiência de carnitina), ela se torna mais importante.

A primeira etapa introduz um grupamento hidroxila no carbono ω (Figura 17-16). O oxigênio para esse grupo vem do oxigênio molecular (O₂) em uma reação complexa que envolve o citocromo P450 e o doador de elétrons NADPH. As reações desse tipo são catalisadas pelas **oxigenases de função mista**, descritas no Quadro 21-1. Duas

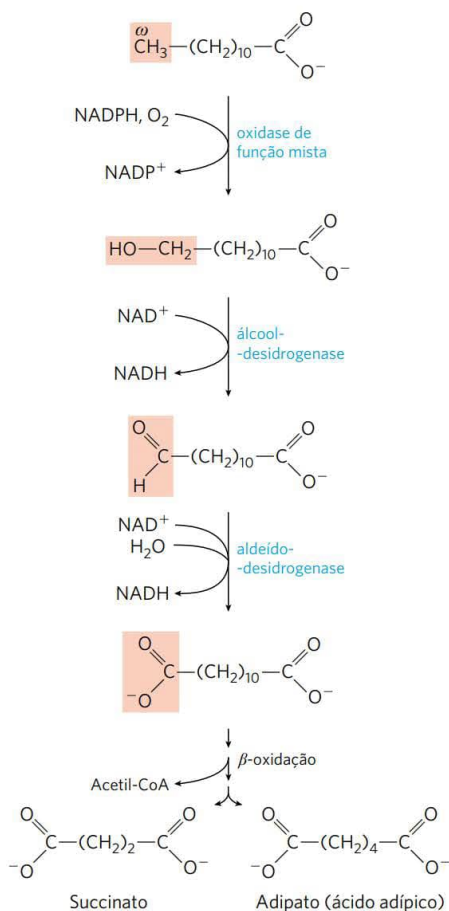


FIGURA 17-16 A ω -oxidação de ácidos graxos no retículo endoplasmático. Esta alternativa à β -oxidação começa com a oxidação do carbono mais distante do carbono β – o carbono ω (ômega). O substrato geralmente é um ácido graxo de cadeia média; o ácido láurico (laurato) é mostrado aqui. Essa via geralmente não é a principal via para o catabolismo oxidativo de ácidos graxos.

outras enzimas, então, atuam sobre o carbono ω : a **álcool-desidrogenase** oxida o grupo hidroxila a um aldeído e a **aldeído-desidrogenase** oxida o grupo aldeído a um ácido carboxílico, produzindo um ácido graxo com um grupo carboxila em cada extremidade. Neste ponto, qualquer das duas extremidades pode ser acoplada à coenzima A, e a molécula pode entrar na mitocôndria e sofrer β -oxidação pela via normal, liberando acetil-CoA e ácidos dicarboxílicos de 12, 10, 8, 6 e 4 carbonos. O ácido de quatro carbonos (ácido succínico) pode entrar no ciclo do ácido cítrico e sofrer oxidação como um combustível.

O ácido fitânico sofre α -oxidação nos peroxissomos



O ácido fitânico, um ácido graxo de cadeia longa com ramificações metila, é derivado da cadeia lateral fitol da clorofila (ver Figura 20-8). A presença de um grupo metila no carbono β deste ácido graxo impede a formação de um intermediário com um grupo cetona no carbono β , tornando impossível sua β -oxidação. Os seres hu-

manos obtêm ácido fitânico da dieta, principalmente a partir de laticínios e de gorduras de animais ruminantes; os microrganismos no rúmen desses animais produzem ácido fitânico na medida em que digerem a clorofila de vegetais. A dieta ocidental típica inclui 50 a 100 mg de ácido fitânico por dia.

O ácido fitânico é metabolizado em peroxissomos via **α -oxidação**, na qual um único carbono é removido da extremidade carboxila do ácido (Figura 17-17). A fitanoil-CoA é inicialmente hidroxilada em seu carbono α em uma reação que envolve oxigênio molecular. O produto é decarboxilado, formando um aldeído contendo um carbono a menos, e então oxidado ao ácido carboxílico correspondente, que agora não apresenta substituintes no carbono β . Subsequentemente, a β -oxidação produz acetil-CoA e

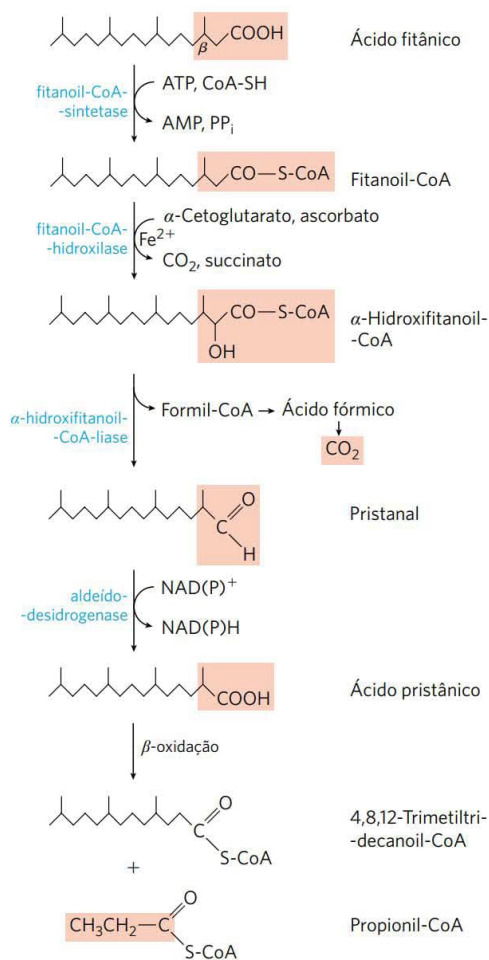


FIGURA 17-17 A α -oxidação de um ácido graxo de cadeia ramificada (ácido fitânico) nos peroxissomos. O ácido fitânico tem um substituinte metila no carbono β e, assim, não pode sofrer β -oxidação. A ação combinada das enzimas mostradas aqui remove o carbono do grupo carboxila do ácido fitânico para produzir ácido pristânico, no qual o carbono β não está substituído, permitindo a β -oxidação. Observe que a β -oxidação do ácido pristânico libera propionil-CoA, e não acetil-CoA. Esta é posteriormente catabolizada como na Figura 17-12. (Os detalhes da reação que produz pristanal continuam controversos.)

então propionil-CoA, em sucessivos ciclos de oxidação. A **doença de Refsum**, resultante de um defeito genético na fitanoil-CoA-hidroxilase, leva a níveis sanguíneos muito elevados de ácido fitânico, causando (por mecanismos desconhecidos) problemas neurológicos graves, incluindo cegueira e surdez. ■

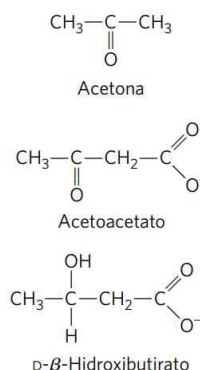
RESUMO 17.2 Oxidação de ácidos graxos

- No primeiro estágio da β -oxidação, quatro reações removem cada unidade de acetil-CoA em sequência a partir da extremidade carboxila de uma acil-CoA com cadeia saturada: (1) desidrogenação dos carbonos α e β (C-2 e C-3) pelas acil-CoA-desidrogenases ligadas a FAD, (2) hidratação da dupla ligação *trans*- Δ^2 resultante pela enoil-CoA-hidratase, (3) desidrogenação da L- β -hidroxiacil-CoA resultante pela β -hidroxiacil-CoA-desidrogenase ligada ao NAD e (4) clivagem, usando CoA, do β -cetoacil-CoA resultante pela tiolase, para formar acetil-CoA e uma acil-CoA encurtada em dois carbonos. Essa acil-CoA de cadeia longa encurtado entra de novo na sequência de reações.
- Na segunda etapa da oxidação dos ácidos graxos, a acetil-CoA é oxidada a CO_2 no ciclo do ácido cítrico. Uma grande fração do rendimento teórico de energia livre da oxidação dos ácidos graxos é recuperada como ATP pela fosforilação oxidativa, a etapa final da via oxidativa.
- Malonil-CoA, um intermediário inicial na síntese de ácidos graxos, inibe a carnitina-aciltransferase 1, prevenindo a entrada dos ácidos graxos na mitocôndria, o que bloqueia a degradação dos ácidos graxos enquanto ocorre a síntese.
- Defeitos genéticos na acil-CoA-desidrogenase de cadeia média resultam em uma doença humana grave, assim como ocorre para mutações em outros componentes do sistema de β -oxidação.
- A oxidação de ácidos graxos insaturados requer duas enzimas adicionais: a enoil-CoA-isomerase e a 2,4-dienoil-CoA-redutase. Ácidos graxos de número ímpar de carbonos são oxidados pela via da β -oxidação, gerando acetil-CoA e uma molécula de propionil-CoA. Essa última é carboxilada a metilmalonil-CoA, que é isomerizada a succinil-CoA em uma reação catalisada pela metilmalonil-CoA-mutase, enzima que necessita de coenzima B_{12} .
- Os peroxissomos vegetais e animais e os glioxissomos vegetais realizam a β -oxidação em quatro etapas semelhantes àsquelas da via mitocondrial. A primeira etapa de oxidação, no entanto, transfere elétrons diretamente ao O_2 , gerando H_2O_2 . Os peroxissomos dos tecidos animais especializam-se na oxidação de ácidos graxos de cadeia muito longa e de ácidos graxos ramificados.
- As reações da ω -oxidação, que ocorrem no retículo endoplasmático, produzem intermediários acil-graxo dicarboxílicos, que podem sofrer β -oxidação em qualquer uma das extremidades para gerar ácidos dicarboxílicos curtos, como o succinato.

- As reações da α -oxidação convertem ácidos graxos ramificados, como o ácido fitânico, a produtos que podem sofrer β -oxidação, gerando ao final acetil-CoA e propionil-CoA.

17.3 Corpos cetônicos

Em seres humanos, e na maior parte de outros mamíferos, a acetil-CoA formada no fígado durante a oxidação dos ácidos graxos pode entrar no ciclo do ácido cítrico (estágio 2 da Figura 17-7) ou sofrer conversão a “corpos cetônicos”, **acetona**, **acetoacetato** e **D- β -hidroxibutirato**, para exportação a outros tecidos. (O termo “corpos” é um artefato histórico; os compostos são solúveis no sangue e na urina, não são particulados e nem todos eles são cetonas.)



A acetona, produzida em menor quantidade do que os outros corpos cetônicos, é exalada. O acetoacetato e o D- β -hidroxibutirato são transportados pelo sangue para outros tecidos que não o fígado (tecidos extra-hepáticos), onde são convertidos a acetil-CoA e oxidados no ciclo do ácido cítrico, fornecendo muito da energia necessária para tecidos, como os músculos esquelético e cardíaco e o córtex renal. O encéfalo, que usa preferencialmente glicose como combustível, pode se adaptar ao uso de acetoacetato e D- β -hidroxibutirato em condições de jejum prolongado, quando a glicose não está disponível. Nessa situação, o encéfalo não pode usar ácidos graxos como combustível, pois eles não cruzam a barreira hematoencefálica. A produção e a exportação dos corpos cetônicos do fígado para tecidos extra-hepáticos permite a oxidação contínua de ácidos graxos no fígado quando acetil-CoA não está sendo oxidada no ciclo do ácido cítrico.

Os corpos cetônicos formados no fígado são exportados para outros órgãos como combustível

A primeira etapa na formação de acetoacetato, que ocorre no fígado (**Figura 17-18**), é a condensação enzimática de duas moléculas de acetil-CoA, catalisadas pela tiolase; essa reação é simplesmente o inverso da última etapa da β -oxidação. O acetoacetyl-CoA, então, condensa-se com outra molécula de acetil-CoA, formando **β -hidróxi- β -metilglutaril-CoA (HMG-CoA)**, que é clivado a acetoacetato livre e acetil-CoA. O acetoacetato é reversivelmente reduzido pela D- β -

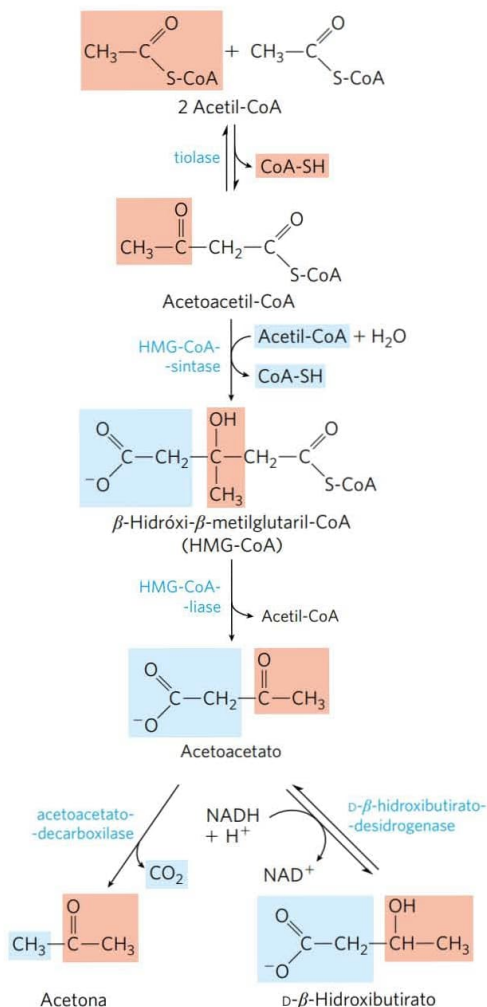


FIGURA 17-18 Formação de corpos cetônicos a partir de acetil-CoA. Pessoas saudáveis e bem nutridas produzem corpos cetônicos a uma taxa relativamente baixa. Quando a acetil-CoA se acumula (p. ex., como no jejum prolongado ou no diabetes não tratado), a tiolase catalisa a condensação de duas moléculas de acetil-CoA em acetoacetyl-CoA, o composto que origina os três corpos cetônicos. As reações da formação de corpos cetônicos ocorrem na matriz das mitocôndrias do fígado. O composto de seis carbonos β-hidróxi-β-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) também é um intermediário da biossíntese de esteróis, mas a enzima que forma HMG-CoA naquela via é citosólica. A HMG-CoA-liase está presente somente na matriz mitocondrial.

hidroxiacetil-CoA, uma enzima mitocondrial, a D-β-hidroxiacetil-CoA-transferase. Essa enzima é específica para o estereoisômero D; ela não atua sobre L-β-hidroxiacetil-CoAs e não deve ser confundida com a L-β-hidroxiacetil-CoA-transferase da via de β-oxidação. Essa diferença na estereoespecificidade das duas enzimas que utilizam β-hidroxiacetil-CoA como substratos na degradação e na síntese de ácidos graxos significa que a célula pode manter conjuntos separados de β-hidroxiacetil-CoAs, marcados para degradação ou para síntese.



Em pessoas saudáveis, a acetona é formada em quantidade muito pequena a partir de acetoacetato, que é facilmente descarboxilado espontaneamente ou pela ação da **acetoacetato-decarboxilase** (Figura 17-18). Como pessoas com diabetes não tratado produzem grandes quantidades de acetoacetato, seu sangue contém quantidades significativas de acetona, que é tóxica. A acetona é volátil e provoca um odor característico no hálito, que algumas vezes é útil no diagnóstico do diabetes. ■

Em tecidos extra-hepáticos, o D-β-hidroxiacetil-CoA é oxidado a acetoacetato pela D-β-hidroxiacetil-CoA-transferase (Figura 17-19). O acetoacetato é ativado ao seu éster de coenzima A pela transferência da CoA do succinil-CoA, intermediário do ciclo do ácido cítrico (ver Figura 16-7), em uma reação catalisada pela **β-cetoacil-CoA-transferase**, também chamada de tioforase. A acetoacetyl-CoA é, então, clivada pela tiolase, gerando duas acetil-CoAs, que entram no ciclo do ácido cítrico. Assim, os corpos cetônicos são usados como combustível em todos os tecidos, exceto o fígado, que não tem β-cetoacil-CoA-transferase. O fígado é, consequentemente, um produtor de corpos cetônicos para os outros tecidos, mas não um consumidor.

A produção e a exportação dos corpos cetônicos pelo fígado permite a oxidação contínua de ácidos graxos com apenas uma mínima oxidação de acetil-CoA. Quando os intermediários do ciclo do ácido cítrico são desviados para

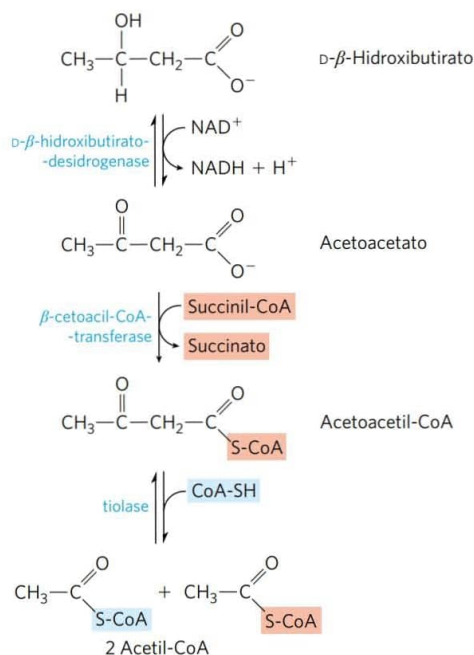


FIGURA 17-19 O D-β-hidroxiacetil-CoA como combustível. O D-β-hidroxiacetil-CoA, sintetizado no fígado, passa para o sangue e, portanto, para outros tecidos, onde é convertido em acetil-CoA em três passos. Ele é primeiro oxidado a acetoacetato, que é ativado pela ligação à coenzima A doada pela succinil-CoA, e, então, clivado pela tiolase. A acetil-CoA assim formada é utilizada para a produção de energia.

a síntese de glicose pela gliconeogênese, por exemplo, a oxidação dos intermediários do ciclo desacelera – bem como a oxidação de acetil-CoA. Além disso, o fígado contém apenas uma quantidade limitada de coenzima A, e, quando a maior parte está comprometida por estar ligada à acetil-CoA, a β -oxidação desacelera por falta de coenzima livre. A produção e a exportação de corpos cetônicos liberam a coenzima A, permitindo a contínua oxidação dos ácidos graxos.

Os corpos cetônicos são produzidos em excesso no diabetes e durante o jejum



Jejum e diabetes melito não tratado levam à superprodução hepática de corpos cetônicos, com vários problemas médicos associados. Durante o jejum, a gliconeogênese consome os intermediários do ciclo do ácido cítrico, desviando acetil-CoA para a produção de corpos cetônicos (Figura 17-20). No diabetes não tratado, quando o nível de insulina é insuficiente, os tecidos extra-hepáticos não podem captar a glicose do sangue de maneira eficiente, para combustível ou para conservação como gordura. Nessas condições, os níveis de malonil-CoA (o material de início para a síntese de ácidos graxos no fígado; ver Figura 21-1) caem, a inibição da carnitina-aciltransferase 1 é aliviada, e os ácidos graxos entram na mitocôndria para serem degradados a acetil-CoA – que não pode passar para o ciclo do ácido cítrico, já que os intermediários do ciclo foram drenados para uso como substrato na gliconeogênese. O acúmulo resultante de

acetil-CoA acelera a formação de corpos cetônicos e sua liberação no sangue em níveis além da capacidade de oxidação dos tecidos extra-hepáticos. O aumento dos níveis sanguíneos de acetoacetato e D- β -hidroxibutirato diminui o pH do sangue, causando a condição conhecida como **acidose**. A acidose extrema pode levar ao coma e, em alguns casos, à morte. Os corpos cetônicos no sangue e na urina de indivíduos com diabetes não tratado podem alcançar níveis extraordinários – uma concentração sanguínea de 90 mg/100 mL (comparado com o nível normal < 3 mg/100 mL) e excreção urinária de 5.000 mg/24h (comparado com uma taxa normal de < 125 mg/24h). Essa condição é denominada **cetose** ou, quando combinada com acidose, **cetoacidose**.

Os indivíduos em dietas hipocalóricas, que utilizam as gorduras armazenadas no tecido adiposo como sua principal fonte de energia, também têm níveis elevados de corpos cetônicos no sangue e na urina. Esses níveis devem ser monitorados para evitar os riscos de cetoacidose. ■

RESUMO 17.3 Corpos cetônicos

- Os corpos cetônicos – acetona, acetoacetato e D- β -hidroxibutirato – são formados no fígado quando os ácidos graxos são o principal combustível a manter o metabolismo corporal. Acetoacetato e D- β -hidroxibutirato são utilizados como combustível em tecidos extra-hepáticos, incluindo o encéfalo, por meio de sua oxidação a acetil-CoA e sua entrada no ciclo do ácido cítrico.
- A superprodução de corpos cetônicos no diabetes não controlado ou na redução intensa da ingestão de calorias pode levar à acidose, ou à cetose, ou a ambas (cetoacidose).

Termos-chave

Termos em negrito estão definidos no glossário.

β -oxidação 649

quilomícron 651

apolipoproteína 651

lipoproteína 651

perilipina 651

ácidos graxos livres 651

albumina sérica 651

lançadeira da carnitina 652

carnitina-aciltransferase 1 653

cotransportador-acil-carnitina/carnitina 653

carnitina-aciltransferase 2 653

proteína trifuncional (TFP) 656

metilmalonil-CoA-mutase 661

coenzima B₁₂ 661

malonil-CoA 661

anemia perniciosa 663

fator intrínseco 663

PPAR (receptor ativado por proliferador de peroxissomos) 664

acil-CoA-desidrogenase de cadeia média (MCAD) 664

proteína multifuncional (MFP) 666

ω -oxidação 666

oxigenases de função mista 667

α -oxidação 667

acidose 670

cetose 670

cetoacidose 670

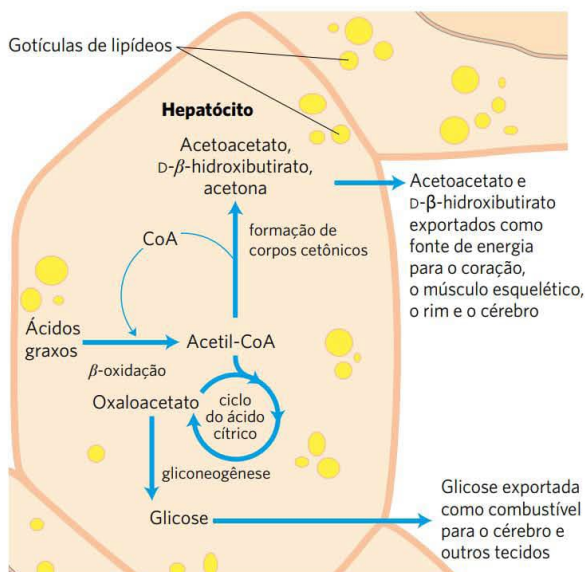


FIGURA 17-20 Formação de corpos cetônicos e exportação a partir do fígado. As condições que promovem a gliconeogênese (diabetes não tratado, redução grave na ingestão de alimento) desaceleram o ciclo do ácido cítrico (pelo consumo do oxaloacetato) e aumentam a conversão de acetil-CoA em acetoacetato. A liberação de coenzima A permite a β -oxidação contínua de ácidos graxos.

Teste seu conhecimento

1. Energia em triacilgliceróis Tendo como base “por átomo de carbono”, onde reside a maior quantidade de energia biologicamente disponível nos triacilgliceróis: na porção ácido graxo ou na porção glicerol? Indique como o conhecimento da estrutura química dos triacilgliceróis fornece a resposta.

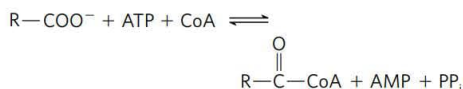
2. Reservas de combustíveis no tecido adiposo Os triacilgliceróis, com seus ácidos graxos semelhantes a hidrocarbonetos, têm o maior conteúdo de energia entre os principais nutrientes.

- Se 15% da massa corporal de um adulto de 70 kg consistem em triacilgliceróis, qual é o total de reserva de combustível disponível, em quilojoules e em quilocalorias, na forma de triacilgliceróis? Lembre-se de que $1,0 \text{ kcal} = 4,18 \text{ kJ}$.
- Se a necessidade energética basal é aproximadamente 8.400 kJ/dia (2.000 kcal/dia), por quanto tempo essa pessoa sobreviveria se a oxidação dos ácidos graxos armazenados como triacilgliceróis fosse a única fonte de energia?
- Qual seria a perda de peso em kg por dia sob essa condição de jejum?

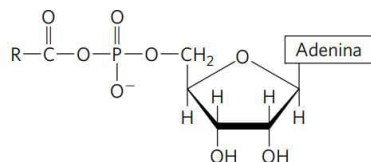
3. Etapas reacionais comuns ao ciclo de oxidação dos ácidos graxos e ao ciclo do ácido cítrico Muitas vezes, as células usam o mesmo padrão de reações enzimáticas para conversões metabólicas análogas. Por exemplo, as etapas da oxidação de piruvato a acetil-CoA e do α -cetoglutarato a succinil-CoA, embora catalisadas por enzimas diferentes, são muito semelhantes. O primeiro estágio da oxidação dos ácidos graxos segue uma sequência reacional muito semelhante a uma sequência do ciclo do ácido cítrico. Use equações para mostrar as sequências de reações análogas nas duas vias.

4. β -Oxidação: quantos ciclos? Quantos ciclos da β -oxidação são necessários para a oxidação completa do ácido oleico ativado, $18:1(\Delta^9)$?

5. Química da reação da acil-CoA-sintetase Os ácidos graxos são convertidos aos seus ésteres de coenzima A em uma reação reversível catalisada pela acil-CoA-sintetase:



- O intermediário ligado à enzima nessa reação foi identificado como o anidrido misto do ácido graxo e do monofosfato de adenosina (AMP), acil-AMP:



Escreva as duas equações correspondentes às duas etapas da reação catalisada pela acil-CoA-sintetase.

- A reação da acil-CoA-sintetase é prontamente reversível, com uma constante de equilíbrio próxima de 1. O que pode ocorrer nessa reação para favorecer a formação de acil-CoA graxo?

6. Intermediários da oxidação do ácido oleico Qual a estrutura do grupo acila parcialmente oxidado que é for-

mado após o ácido oleico, $18:1(\Delta^9)$, ter sofrido três ciclos de β -oxidação? Quais são as duas etapas seguintes na continuação da oxidação desse intermediário?

7. β -Oxidação de um ácido graxo com número ímpar de carbonos Quais são os produtos diretos da β -oxidação de um ácido graxo completamente saturado de 11 carbonos?

8. Oxidação do palmitato triciado O palmitato marcado uniformemente com trício (^3H), com uma atividade específica de $2,48 \times 10^8$ contagens por minuto (cpm) por micromol de palmitato, é adicionado a uma preparação mitocondrial que o oxida a acetil-CoA. A acetil-CoA é isolada e hidrolisada a acetato. A atividade específica do acetato isolado é $1,0 \times 10^7$ cpm/ μmol . Esse resultado é consistente com a via da β -oxidação? Explique. Qual é o destino final do trício removido?

9. Compartimentalização da β -oxidação Palmitato livre é ativado, produzindo seu derivado de coenzima A (palmitoil-CoA) no citosol antes de ser oxidado na mitocôndria. Se palmitato e [^{14}C]coenzima A são adicionados a um homogeneizado de fígado, o palmitoil-CoA isolado da fração citosólica será radioativo, mas o isolado da fração mitocondrial, não. Explique.

10. Bioquímica comparativa: vias geradoras de energia em pássaros Uma indicação da importância relativa das várias vias produtoras de ATP é a $V_{\text{máx}}$ de certas enzimas dessas vias. Os valores de $V_{\text{máx}}$ de várias enzimas dos músculos peitorais (músculo do peito usado para voar) de pombo e faisão estão listados abaixo.

Enzima	$V_{\text{máx}}$ ($\mu\text{mol substrato/min/g tecido}$)	
	Pombo	Faisão
Hexocinase	3,0	2,3
Glicogênio-fosforilase	18,0	120,0
Fosfofrutocinase 1	24,0	143,0
Citrato-sintase	100,0	15,0
Triacilglicerol-lipase	0,07	0,01

- Discuta a importância relativa do metabolismo do glicogênio e das gorduras na geração de ATP nos músculos peitorais desses pássaros.
- Compare o consumo de oxigênio nos dois pássaros.
- A julgar pelos dados na tabela, qual pássaro é voador de longas distâncias? Justifique sua resposta.
- Por que essas enzimas em particular foram selecionadas para a comparação? As atividades da triose-fosfato-isomerase e da malato-desidrogenase seriam igualmente boas para comparação? Explique.

11. Carnitina-aciltransferase mutante O que muda no padrão metabólico resultante de uma mutação na carnitina-acil-transferase 1 muscular, em que a proteína mutante perdeu sua afinidade por malonil-CoA, mas não sua atividade catalítica?



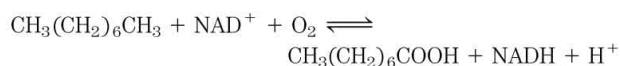
12. Efeito da deficiência de carnitina Um indivíduo desenvolveu uma condição caracterizada por fraqueza muscular progressiva e dolorosas câibras musculares. Os sintomas foram agravados durante o jejum, o exercício e a dieta rica em gordura. O homogeneizado de uma amostra de músculo esquelético do paciente oxida oleato mais lentamente do que um homogeneizado-controle, consistindo de amostras de músculo de indivíduos saudáveis. Quando a carnitina foi adicionada ao homo-

geneizado de músculo do paciente, a taxa de oxidação do oleato igualou-se à do homogeneizado-controle. O paciente foi diagnosticado como portador de uma deficiência de carnitina.

- Por que a carnitina adicionada aumenta a taxa de oxidação do oleato no homogeneizado de músculo do paciente?
- Por que os sintomas do paciente se agravaram durante o jejum, o exercício e em dieta rica em gordura?
- Sugira duas razões possíveis para a deficiência de carnitina muscular desse indivíduo.

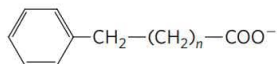
13. Os ácidos graxos como fonte de água Ao contrário da lenda, os camelos não armazenam água em suas corcovas, que consistem, na verdade, em um grande depósito de gordura. Como esses depósitos de gorduras podem servir de fonte de água? Calcule a quantidade de água (em litros) que o camelo pode produzir a partir de 1,0 kg de gordura. Assuma, para simplificação, que a gordura é totalmente formada por tripalmitoilglicerol.

14. Petróleo como fonte de alimento para micróbios Alguns microrganismos do gênero *Nocardia* e *Pseudomonas* podem crescer em um ambiente em que hidrocarbonetos são as únicas fontes de energia. Essas bactérias oxidam hidrocarbonetos alifáticos de cadeia linear, como octano, aos seus ácidos carboxílicos correspondentes:



Como essas bactérias poderiam ser usadas para limpeza de derramamento de óleo? Quais seriam os fatores limitantes na eficiência desse processo?

15. Metabolismo de um ácido graxo de cadeia linear com fenila terminal Um metabólito cristalino foi isolado da urina de um coelho que foi alimentado com dieta contendo um ácido graxo de cadeia linear com um grupo fenila terminal:



Uma amostra de 302 mg do metabólito em solução aquosa foi completamente neutralizada por 22,2 mL de NaOH 0,100 M.

- Qual é a provável massa molecular e estrutura do metabólito?
- O ácido graxo de cadeia linear tinha um número par ou ímpar de grupos metileno ($-\text{CH}_2-$) (i.e., n é par ou ímpar)? Explique.



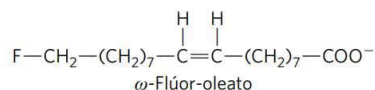
16. A oxidação de ácidos graxos em diabetes não controlado Quando a acetil-CoA produzida durante a β -oxidação no fígado excede a capacidade do ciclo do ácido cítrico, o excesso de acetil-CoA forma corpos cetônicos – acetona, acetoacetato e D- β -hidroxibutirato. Isso ocorre no diabetes grave não controlado: já que os tecidos não podem usar glicose, eles oxidam grandes quantidades de ácidos graxos. Apesar de a acetil-CoA não ser tóxica, a mitocôndria deve desviar este composto para a produção de corpos cetônicos. Qual problema surgiria se a acetil-CoA não fosse convertida em corpos cetônicos? Como o desvio para a produção de corpos cetônicos soluciona esse problema?

17. Consequências de uma dieta rica em gordura sem carboidratos Suponha que você tivesse que sobreviver com uma dieta de gordura de baleia e foca, com pouco ou sem carboidrato.

- Qual seria o efeito da privação de carboidrato na utilização de gordura para energia?
- Se a sua dieta fosse completamente desprovida de carboidratos, seria melhor consumir ácidos graxos de cadeia par ou ímpar? Explique.

18. Ácidos graxos de cadeia par e ímpar na dieta Em um experimento laboratorial, dois grupos de ratos foram alimentados com dois tipos de ácidos graxos diferentes como única fonte de carbono por um mês. O primeiro grupo recebeu ácido heptanoico (7:0), e o segundo recebeu ácido octanoico (8:0). Após o experimento, uma notável diferença foi percebida entre os dois grupos. Aqueles do primeiro grupo estão saudáveis e ganharam peso, ao passo que aqueles do segundo grupo estão fracos e perderam peso, como resultado da perda de massa muscular. Qual é a base bioquímica para essa diferença?

19. Consequências metabólicas da ingestão de ω -flúor-oleato O arbusto *Dichapetalum toxicarium*, nativo da Serra Leoa, produz ω -flúor-oleato, altamente tóxico para animais de sangue quente.



Essa substância tem sido utilizada como veneno de flecha, e a polpa desidratada do fruto dessa planta é usada algumas vezes como veneno de rato (daí o nome comum da planta: *ratsbane*). Por que essa substância é tão tóxica? (Dica: revise o Capítulo 16, Problema 22).

20. Mutação da acetil-CoA-carboxilase Quais seriam as consequências para o metabolismo das gorduras de uma mutação na acetil-CoA-carboxilase que levasse à substituição do resíduo de Ser normalmente fosforilado pela AMPK por um resíduo de Ala? O que aconteceria se a mesma Ser fosse substituída por Asp? (Dica: ver Figura 17-13.)

21. Efeito dos inibidores de PDE sobre os adipócitos Como seria afetada a resposta de um adipócito à adrenalina pela adição de um inibidor da fosfodiesterase (PDE) do cAMP? (Dica: ver Figura 12-4.)

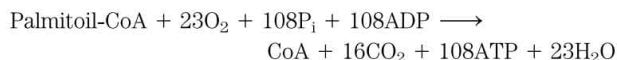
22. Função do FAD como aceptor de elétrons A acil-CoA-desidrogenase utiliza FAD ligado à enzima como grupo prostético para desidrogenar os carbonos α e β da acil-CoA. Qual é a vantagem de usar FAD como aceptor de elétrons em vez de NAD^+ ? Explique em termos dos potenciais de redução padrão para as semirreações: Enz-FAD/FADH_2 ($E'^\circ = -0,219 \text{ V}$) e NAD^+/NADH ($E'^\circ = -0,320 \text{ V}$).

23. β -Oxidação do ácido araquidônico Quantas voltas do ciclo de oxidação dos ácidos graxos são necessárias para a oxidação completa do ácido araquidônico (ver Tabela 10-1) a acetil-CoA?

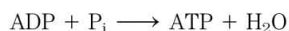
24. Destino do propionato marcado Se $[3-^{14}\text{C}]$ propionato (^{14}C no grupo metila) é adicionado a um homogeneizado de fígado, ^{14}C -oxalacetato é produzido rapidamente. Desenhe um fluxograma para a via pela qual o propionato é transformado em oxalacetato, e indique a localização do ^{14}C no oxalacetato.

25. Metabolismo do ácido fitânico Quando um rato é alimentado com ácido fitânico uniformemente marcado com ^{14}C , em poucos minutos a radioatividade pode ser detectada no malato, um intermediário do ciclo do ácido cítrico. Desenhe uma via metabólica que poderia explicar isso. Quais dos átomos de carbono no malato conteriam a marcação com ^{14}C ?

26. Fontes de H_2O produzida na β -oxidação A oxidação completa do palmitoil-CoA a dióxido de carbono e água está representada pela equação geral



A água também é produzida na reação



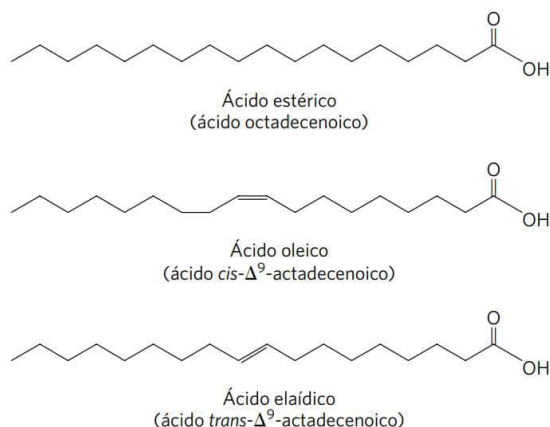
mas não está incluída como produto na equação global. Por quê?

27. Importância biológica do cobalto Em gado, veado, ovelha e em outros animais ruminantes, são formadas grandes quantidades de propionato no rúmen por meio da fermentação bacteriana da matéria vegetal ingerida. O propionato é a principal fonte de glicose para esses animais, pela rota: propionato \longrightarrow oxalacetato \longrightarrow glicose. Em algumas áreas do mundo, principalmente na Austrália, os animais ruminantes algumas vezes mostram sintomas de anemia com concomitante perda de apetite e retardo no crescimento, resultantes da incapacidade de transformar propionato em oxalacetato. Essa condição deve-se à deficiência de cobalto, causada por níveis muito baixos de cobalto no solo e por consequência na matéria vegetal. Explique.

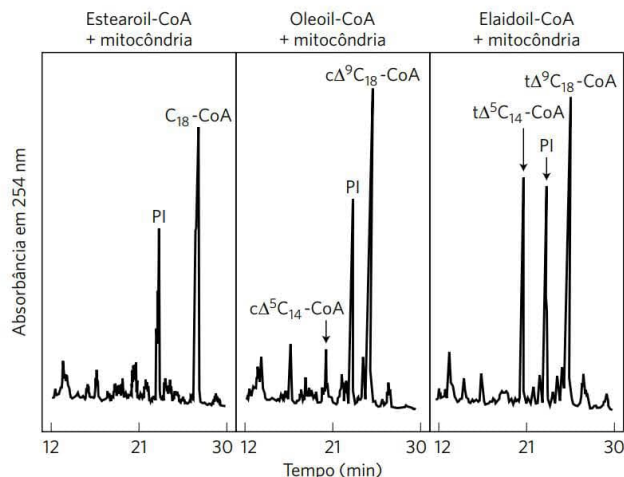
28. Perda de gordura durante hibernação Os ursos consomem cerca de 25×10^6 J/dia durante períodos de hibernação, que podem durar até sete meses. A energia necessária para sustentar a vida é obtida da oxidação de ácidos graxos. Quanta perda de peso (em quilogramas) ocorre após sete meses? Como a cetose pode ser minimizada durante a hibernação? (Considere um rendimento de 38 kJ/g para a oxidação de gorduras.)

Problema de análise de dados

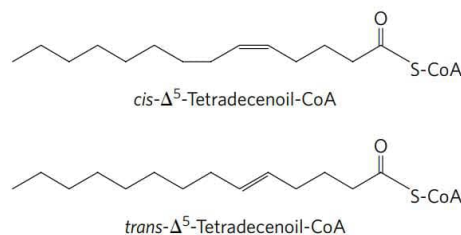
29. β -Oxidação de gorduras *trans* Gorduras insaturadas com ligações duplas *trans* são comumente conhecidas como “gorduras *trans*”. Tem havido muita discussão acerca dos efeitos das gorduras *trans* da dieta na saúde. Em seus trabalhos sobre os efeitos do metabolismo dos ácidos graxos *trans* sobre a saúde, Yu e colaboradores (2004) mostraram que um ácido graxo *trans* foi processado diferentemente do seu isômero *cis*. Eles usaram três ácidos graxos relacionados de 18 carbonos para investigar a diferença na β -oxidação entre os isômeros *cis* e *trans* de ácidos graxos de mesmo tamanho.



Os pesquisadores incubaram os derivados de coenzima A de cada ácido com mitocôndria hepática de rato por 5 minutos, e então separaram os derivados de CoA remanescentes em cada mistura por HPLC (cromatografia líquida de alto desempenho). Os resultados estão mostrados a seguir, com painéis separados para os três experimentos.



Nesta figura, PI indica um padrão interno (pentadecanoil-CoA) adicionado à mistura, após a reação, como marcador molecular. Os pesquisadores utilizaram abreviaturas dos derivados CoA como segue: estearoil-CoA, C_{18} -CoA; *cis*- Δ^5 -tetradecenoil-CoA, $\text{c}\Delta^5\text{C}_{14}$ -CoA; oleoil-CoA, $\text{c}\Delta^9\text{C}_{18}$ -CoA; *trans*- Δ^5 -tetradecenoil-CoA, $\text{t}\Delta^5\text{C}_{14}$ -CoA; e elaidoil-CoA, $\text{t}\Delta^9\text{C}_{18}$ -CoA.



- Por que Yu e colaboradores precisaram usar derivados de CoA em vez de usar os ácidos graxos livres nesses experimentos?
- Por que não foram encontrados derivados de CoA de peso molecular mais baixo na reação com estearoil-CoA?
- Quantas voltas da β -oxidação seriam necessárias para converter oleoil-CoA e elaidoil-CoA em *cis*- Δ^5 -tetradecenoil-CoA e *trans*- Δ^5 -tetradecenoil-CoA, respectivamente?

Yu e colaboradores mediram os parâmetros cinéticos de duas formas da enzima acil-CoA-desidrogenase: acil-CoA-desidrogenase de cadeia longa (LCAD) e acil-CoA-desidrogenase de cadeia muito longa (VLCAD). Eles utilizaram os derivados CoA de três ácidos graxos: tetradecanoil-CoA (C_{14} -CoA), *cis*- Δ^5 -tetradecenoil-CoA ($\text{c}\Delta^5\text{C}_{14}$ -CoA) e *trans*- Δ^5 -tetradecenoil-CoA ($\text{t}\Delta^5\text{C}_{14}$ -CoA). Os resultados estão mostrados a seguir. (Ver, no Capítulo 6, definições dos parâmetros cinéticos.)

	LCAD			VLCAD		
	C_{14} -CoA	$\text{c}\Delta^5\text{C}_{14}$ -CoA	$\text{t}\Delta^5\text{C}_{14}$ -CoA	C_{14} -CoA	$\text{c}\Delta^5\text{C}_{14}$ -CoA	$\text{t}\Delta^5\text{C}_{14}$ -CoA
$V_{\text{máx}}$	3,3	3,0	2,9	1,4	0,32	0,88
K_{m}	0,41	0,40	1,6	0,57	0,44	0,97
k_{cat}	9,9	8,9	8,5	2,0	0,42	1,12
$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$	24	22	5	4	1	1

- Para LCAD, a K_{m} difere radicalmente para os substratos *cis* e *trans*. Dê uma explicação plausível para essa observação

nos termos das estruturas das moléculas dos substratos. (Dica: talvez você queira utilizar a Figura 10-1.)

- (e) Os parâmetros cinéticos das duas enzimas são relevantes para o processamento diferencial desses ácidos graxos *apenas* se a reação da LCAD ou da VLCAD (ou de ambas) for a etapa limitante da via. Que evidência existe para apoiar essa suposição?
- (f) Como a diferença desses parâmetros cinéticos explica os níveis diferentes dos derivados de CoA encontrados após a incubação da mitocôndria hepática de rato com estearoil-CoA, oleoil-CoA e elaidoil-CoA (mostrados na figura com três painéis)?

Yu e colaboradores mediram a especificidade, pelos substratos, da tioesterase de mitocôndria de fígado de rato, que hidrolisa acil-CoA em CoA e ácido graxo livre. Essa enzima foi aproximadamente duas vezes mais ativa com tioésteres C_{14} -CoA do que com tioésteres C_{18} -CoA.

- (g) Outros pesquisadores sugeriram que ácidos graxos livres podem passar através das membranas. Em seus

experimentos, Yu e colaboradores encontraram o ácido *trans*- Δ^5 -tetradecenoico fora da mitocôndria (i.e., no meio de incubação) que fora incubada com elaidoil-CoA. Descreva a via que leva a esse ácido *trans*- Δ^5 -tetradecenoico extramitocondrial. Não se esqueça de indicar onde na célula as várias transformações ocorrem, assim como as enzimas que catalisam as transformações.

- (h) Costuma-se dizer na mídia popular que “gorduras *trans* não são degradadas por suas células e, em vez disso, acumulam-se no seu corpo”. Em qual sentido essa afirmativa é correta e em qual sentido ela é uma grande simplificação?

Referência

Yu, W., X. Liang, R. Ensenauer, J. Vockley, L. Sweetman e H. Schultz. 2004. Leaky β -oxidation of a *trans*-fatty acid. *J. Biol. Chem.* 279:52,160–52,167.

Oxidação de aminoácidos e produção de ureia

- 18.1 Destinos metabólicos dos grupos amina 675**
18.2 Excreção de nitrogênio e ciclo da ureia 684
18.3 Vias da degradação dos aminoácidos 690

Agora, serão abordados os aminoácidos, a última classe de biomoléculas que, por sua degradação oxidativa, contribui significativamente para a produção de energia metabólica. A fração de energia metabólica obtida a partir de aminoácidos, sejam eles provenientes de proteínas da dieta ou de proteínas teciduais, varia muito de acordo com o tipo de organismo e com as condições metabólicas. Os carnívoros consomem basicamente proteínas e, assim, devem obter a maior parte de sua energia a partir dos aminoácidos, ao passo que os herbívoros obtêm apenas uma pequena fração de suas necessidades energéticas a partir dessa via. A maior parte dos microrganismos pode obter aminoácidos a partir do ambiente e os utiliza como combustível quando suas condições metabólicas assim o determinarem. As plantas, no entanto, nunca ou quase nunca oxidam aminoácidos para produzir energia; em geral, os carboidratos produzidos a partir de CO_2 e H_2O na fotossíntese são sua única fonte de energia. As concentrações de aminoácidos nos tecidos vegetais são cuidadosamente reguladas para satisfazer as necessidades de biossíntese de proteínas, ácidos nucleicos e outras moléculas necessárias para o crescimento. O catabolismo dos aminoácidos ocorre em plantas, mas seu propósito é a produção de metabólitos para outras vias biossintéticas.

Nos animais, os aminoácidos sofrem degradação oxidativa em três circunstâncias metabólicas diferentes:

1. Durante a síntese e a degradação normais de proteínas celulares (renovação proteica; Capítulo 27), alguns aminoácidos liberados pela hidrólise de proteínas não são necessários para a biossíntese de novas proteínas, sofrendo degradação oxidativa.
2. Quando uma dieta é rica em proteínas e os aminoácidos ingeridos excedem as necessidades do organismo para a síntese proteica, o excesso é catabolizado; os aminoácidos não podem ser armazenados.
3. Durante o jejum ou no diabetes melito não controlado, quando os carboidratos estão indisponíveis ou são utilizados de modo inadequado, as proteínas celulares são utilizadas como combustível.

Em todas essas condições metabólicas, os aminoácidos perdem seu grupo amina para formar α -cetoácidos, os “esqueletos de carbono” dos aminoácidos. Os α -cetoácidos sofrem oxidação a CO_2 e H_2O ou, geralmente mais importante, fornecem unidades de três e quatro carbonos que podem ser convertidas, pela gliconeogênese, em glicose, o combustível para o cérebro, para o músculo esquelético e para outros tecidos.

As vias do catabolismo dos aminoácidos são bastante semelhantes na maioria dos organismos. O foco deste capítulo se concentra nas vias em vertebrados, pois estas têm recebido maior atenção por parte dos pesquisadores. Assim como no catabolismo dos carboidratos e dos ácidos graxos, os processos de degradação de aminoácidos convergem para vias catabólicas centrais, com os esqueletos de carbono da maioria dos aminoácidos encontrando uma via para o ciclo do ácido cítrico. Em alguns casos, as reações das vias de degradação dos aminoácidos representam etapas paralelas no catabolismo dos ácidos graxos (ver Figura 17-9).

Uma característica importante distingue a degradação dos aminoácidos de outros processos catabólicos descritos até aqui: todos os aminoácidos contêm um grupo amina, e as vias para a degradação dos aminoácidos incluem, portanto, uma etapa fundamental, na qual o grupo α -amina é separado do esqueleto carbonado e desviado para as vias do metabolismo do grupo amina (**Figura 18-1**). Serão discutidos inicialmente o metabolismo do grupo amina e a excreção do nitrogênio e, a seguir, o destino dos esqueletos carbonados derivados dos aminoácidos; ao longo deste estudo, será examinado de que modo essas vias estão interconectadas.

18.1 Destinos metabólicos dos grupos amina

O nitrogênio, N_2 , é abundante na atmosfera, mas é inerte para a utilização na maioria dos processos bioquímicos. Pelo fato de que apenas poucos microrganismos conseguem converter o N_2 em formas biologicamente úteis, como NH_3 (Capítulo 22), os grupos amina são cuidadosamente gerenciados nos sistemas biológicos.

A **Figura 18-2a** fornece uma visão geral das vias catabólicas da amônia e dos grupos amina nos vertebrados. Os aminoácidos derivados das proteínas da dieta são a origem da maioria dos grupos amina. A maior parte dos aminoáci-

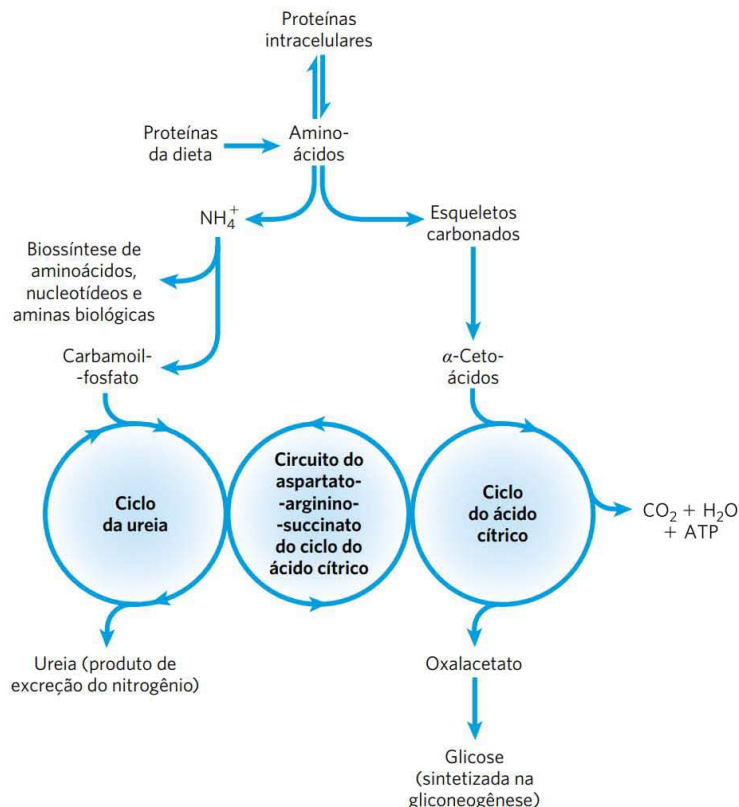


FIGURA 18-1 Visão geral do catabolismo dos aminoácidos nos mamíferos. Os grupos amina e os esqueletos carbonados tomam vias separadas, porém interconectadas.

dos é metabolizada no fígado. Parte da amônia gerada nesse processo é reciclada e utilizada em uma variedade de vias biossintéticas; o excesso é excretado diretamente ou convertido em ureia ou ácido úrico para excreção, dependendo do organismo (Figura 18-2b). O excesso de amônia produzido em outros tecidos (extra-hepáticos) é enviado ao fígado (na forma de grupos amina, como descrito a seguir) para conversão em sua forma de excreção.

Quatro aminoácidos desempenham papéis centrais no metabolismo do nitrogênio: glutamato, glutamina, alanina e aspartato. O lugar especial desses quatro aminoácidos no metabolismo do nitrogênio não é um acidente evolutivo. Esses aminoácidos em especial são aqueles mais facilmente convertidos em intermediários do ciclo do ácido cítrico: glutamato e glutamina são convertidos em α -cetoglutarato, alanina em piruvato e aspartato em oxalacetato. Glutamato e glutamina são especialmente importantes, atuando como uma espécie de ponto de encontro para os grupos amina. No citosol dos hepatócitos (células do fígado), os grupos amina da maioria dos aminoácidos são transferidos ao α -cetoglutarato, formando glutamato, que entra na mitocôndria e cede seu grupo amina para formar NH_4^+ . O excesso de amônia gerado na maioria dos demais tecidos é convertido no nitrogênio amídico da glutamina, que passa para o fígado e, então, para as mitocôndrias hepáticas. Glutamina, glutamato ou ambos estão presentes na maior

parte dos tecidos em concentrações mais elevadas que os demais aminoácidos.

No músculo esquelético, os grupos amina que excedem as necessidades geralmente são transferidos ao piruvato para formar alanina, outra molécula importante para o transporte de grupos amina até o fígado. Será mostrado na Seção 18.2 que o aspartato participa dos processos metabólicos que ocorrem tão logo os grupos amina sejam entregues no fígado.

A presente discussão começa com a degradação das proteínas da dieta e depois faz uma descrição geral dos destinos metabólicos dos grupos amina.

As proteínas da dieta são enzimaticamente degradadas até aminoácidos

Em seres humanos, a degradação das proteínas ingeridas até seus aminoácidos constituintes acontece no trato gastrointestinal. A chegada de proteínas da dieta ao estômago estimula a mucosa gástrica a secretar o hormônio **gastrina**, que, por sua vez, estimula a secreção de ácido clorídrico pelas células parietais e de pepsinogênio pelas células principais das glândulas gástricas (Figura 18-3a). A acidez do suco gástrico (pH 1,0 a 2,5) lhe permite funcionar tanto como antisséptico, matando a maior parte das bactérias e de outras células estranhas ao organismo, quanto como agente desnaturante, desenovelando proteínas globulares

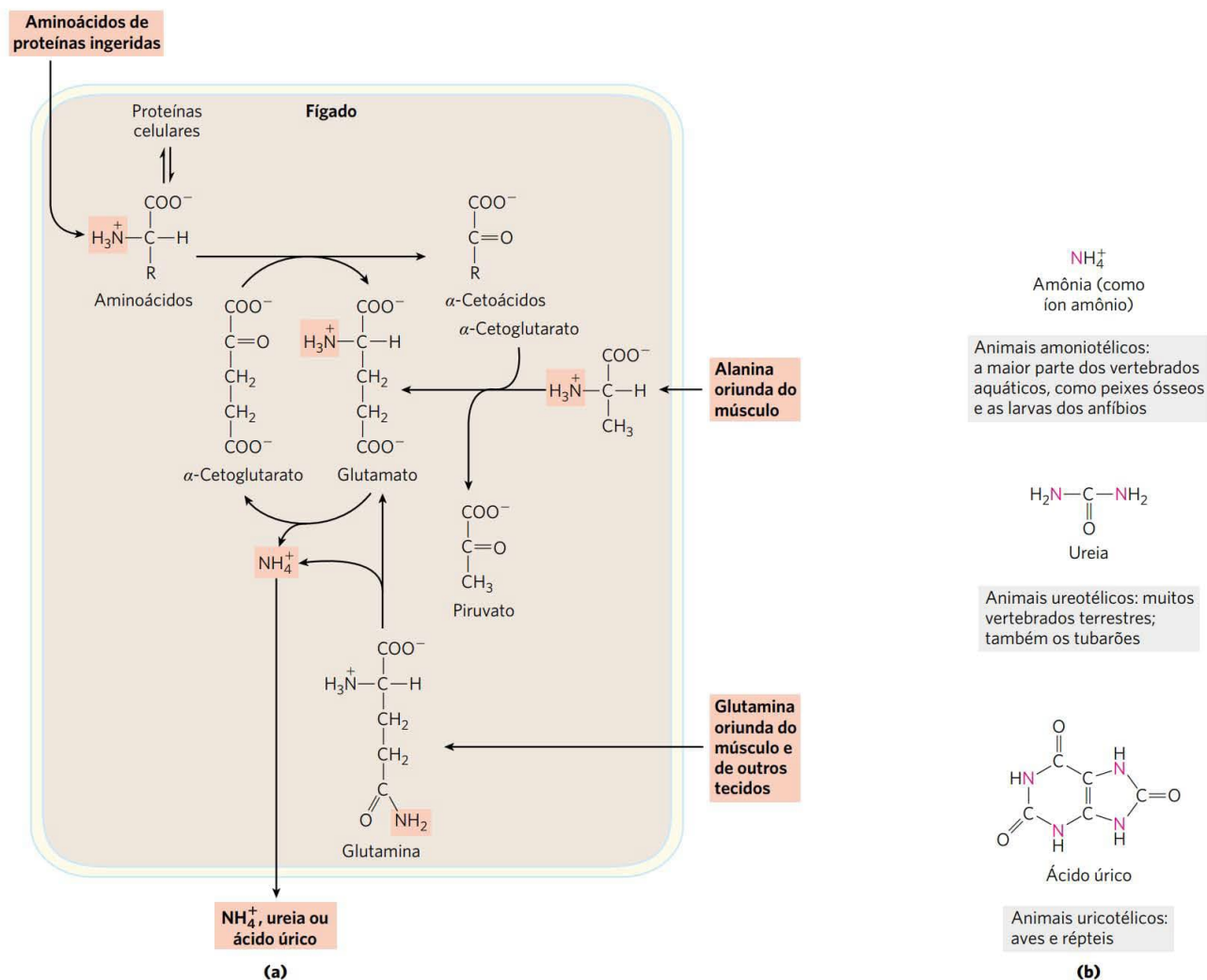


FIGURA 18-2 Catabolismo dos grupos amina. (a) Visão geral do catabolismo dos grupos amina (sombreados) no fígado de vertebrados. (b) Formas de excreção do nitrogênio. O excesso de NH₄⁺ é excretado como amônia (micróbios, peixes ósseos), ureia (maior parte dos vertebrados terrestres) ou ácido úrico (aves e répteis terrestres). Observe que os átomos de carbono da ureia e do ácido úrico estão altamente oxidados; o organismo descarta carbonos apenas após extrair a maior parte da energia de oxidação disponível.

e tornando suas ligações peptídicas internas mais suscetíveis à hidrólise enzimática. O **pepsinogênio** (M_r 40.554), um precursor inativo ou zimogênio (p. 230), é convertido na pepsina ativa (M_r 34.614) por meio de uma clivagem autocatalisada (clivagem mediada pelo próprio pepsinogênio) que ocorre apenas em pH baixo. No estômago, a pepsina hidrolisa as proteínas ingeridas, atuando em ligações peptídicas no lado aminoterminal de resíduos de leucina ou dos aminoácidos aromáticos Phe, Trp e Tyr (ver Tabela 3-6), clivando cadeias polipeptídicas longas em uma mistura de peptídeos menores.

À medida que o conteúdo ácido do estômago passa para o intestino delgado, o pH baixo desencadeia a secreção do hormônio **secretina** na corrente sanguínea. A secretina estimula o pâncreas a secretar bicarbonato no intestino delgado, para neutralizar o HCl gástrico, aumentando

abruptamente o pH, que fica próximo a 7. (Todas as secreções pancreáticas chegam ao intestino delgado pelo ducto pancreático.) A digestão das proteínas prossegue agora no intestino delgado. A chegada de aminoácidos na parte superior do intestino delgado (duodeno) determina a liberação para o sangue do hormônio **colecistocinina**, que estimula a secreção de diversas enzimas pancreáticas com atividades ótimas em pH 7 a 8. O **tripsinogênio**, o **quimotripsinogênio** e as **procarboxipeptidases A e B** – os zimogênios da **tripsina**, da **quimotripsina** e das **carboxipeptidases A e B** – são sintetizados e secretados pelas células exócrinas do pâncreas (Figura 18-3b). O tripsinogênio é convertido em sua forma ativa, a tripsina, pela **enteropeptidase**, uma enzima proteolítica secretada pelas células intestinais. A tripsina livre catalisa, então, a conversão de moléculas adicionais de tripsinogênio em tripsina (ver Figura 6-39).

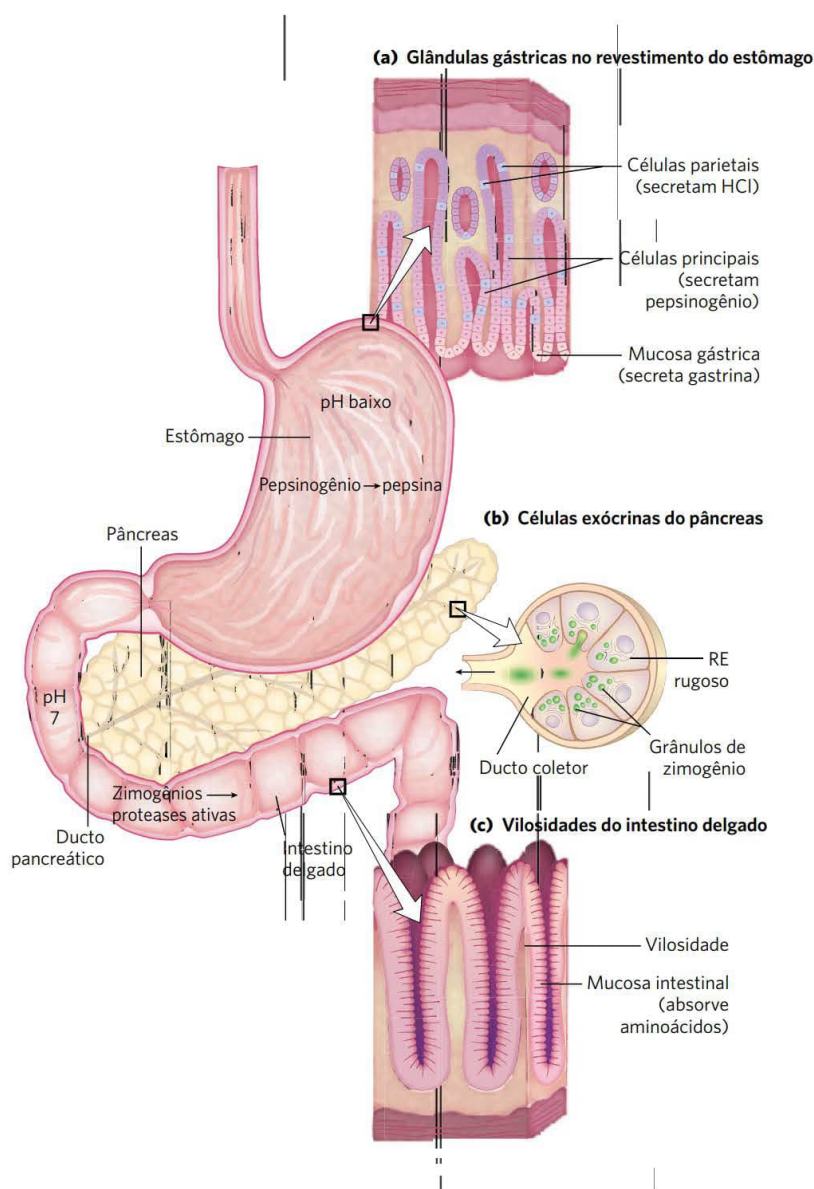


FIGURA 18-3 Parte do trato digestório (gastrointestinal) humano. (a) As células parietais e as células principais das glândulas gástricas secretam seus produtos em resposta ao hormônio gastrina. A pepsina inicia o processo de degradação das proteínas no estômago. (b) O citoplasma das células exócrinas do pâncreas é completamente preenchido pelo retículo endoplasmático rugoso, o sítio de síntese dos zimogênios de muitas enzimas digestivas. Os zimogênios são concentrados em partículas de transporte circundadas por membranas, denominadas grânulos de zimogênios. Quando uma célula exócrina é estimulada, sua membrana plasmática funde-se com a membrana do grânulo de zimogênio e o conteúdo do grânulo é liberado por exocitose no lúmen do ducto coletor. Os ductos coletores levam, por fim, ao ducto pancreático e daí ao intestino delgado. (c) No intestino delgado, os aminoácidos são absorvidos pela camada de células epiteliais (mucosa intestinal) das vilosidades e chegam aos capilares. Lembre-se de que os produtos da hidrólise dos lipídeos no intestino delgado, após sua absorção pela mucosa intestinal, entram no sistema linfático (ver Figura 17-1).

A tripsina também ativa o quimotripsinogênio, as procarboxipeptidases e a proelastase.

Qual a razão para esse mecanismo elaborado de ativação de enzimas digestivas dentro do trato gastrointestinal? A síntese dessas enzimas como precursores inativos protege as células exócrinas de um ataque proteolítico destrutivo.

O pâncreas se protege ainda contra a autodigestão pela produção de um inibidor específico, uma proteína chamada de **inibidor pancreático da tripsina** (p. 231). Dado o papel central da tripsina nas vias de ativação proteolítica, a inibição da tripsina previne efetivamente a produção prematura de enzimas proteolíticas ativas dentro das células pancreáticas.

A tripsina e a quimotripsina continuam a hidrólise dos peptídeos produzidos pela pepsina no estômago. Esse estágio da digestão proteica é realizado com grande eficiência, pois a tripsina e a quimotripsina apresentam especificidades distintas quanto aos aminoácidos sobre os quais atuam (ver Tabela 3-6). A degradação de pequenos peptídeos no intestino delgado é, então, completada por outras peptidases intestinais. Estas incluem as carboxipeptidases A e B (duas enzimas que contêm zinco), as quais removem resíduos sucessivos da extremidade carboxila dos peptídeos e uma **aminopeptidase**, que hidrolisa resíduos sucessivos da porção aminoterminal de peptídeos pequenos. A mistura resultante de aminoácidos livres é transportada para dentro das células epiteliais que revestem o intestino delgado (Figura 18-3c), através das quais os aminoácidos entram nos capilares sanguíneos nas vilosidades e são transportados até o fígado. Nos seres humanos, a maior parte das proteínas globulares obtidas a partir de fontes animais é hidrolisada quase completamente até aminoácidos no trato gastrointestinal, porém algumas proteínas fibrosas, como a queratina, são digeridas apenas parcialmente. Além disso, o conteúdo proteico de alguns alimentos obtidos a partir de fontes vegetais está protegido contra a degradação por envoltórios não digeríveis de celulose.



A **pancreatite aguda** é uma doença causada por obstrução da via normal pela qual as secreções pancreáticas chegam ao intestino. Os zimogênios das enzimas proteolíticas são prematuramente convertidos em suas formas cataliticamente ativas *dentro* das células pancreáticas e atacam o próprio tecido pancreático. Isso causa dores intensas e lesão ao órgão, o que pode ser fatal. ■

O piridoxal-fosfato participa da transferência de grupos α -amina para o α -cetoglutarato

Chegando ao fígado, a primeira etapa no catabolismo da maioria dos L-aminoácidos é a remoção de seus grupos α -amina, realizada por enzimas denominadas **aminotransferases** ou **transaminases**. Nessas reações de **transaminação**, o grupo α -amino é transferido para o carbono α do α -cetoglutarato, liberando o correspondente α -cetoácido, análogo do aminoácido (Figura 18-4). Não ocorre desaminação (perda de grupos amino) efetiva nessas reações, pois o α -cetoglutarato torna-se aminado enquanto o α -aminoácido é desaminado. O efeito das reações de transaminação é coletar grupos amina de diferentes aminoácidos na forma de L-glutamato. O glutamato, então, funciona como doador de grupos amina para vias biossintéticas ou para vias de excreção, que levam à eliminação de produtos de excreção nitrogenados.

As células contêm tipos diferentes de aminotransferases. Muitas são específicas para o α -cetoglutarato comoceptor do grupo amina, mas diferem em sua especificidade para o L-aminoácido. Essas enzimas são denominadas em função do doador do grupo amina (p. ex., alanina-aminotransferase, aspartato-aminotransferase). As reações catalisadas pelas aminotransferases são livremente reversíveis, tendo uma constante de equilíbrio de cerca de 1,0 ($\Delta G^{or} \approx 0$ kJ/mol).

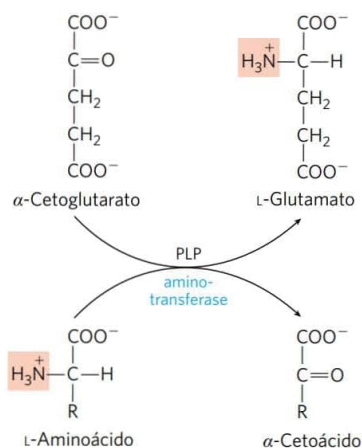


FIGURA 18-4 Transaminações catalisadas por enzimas. Em muitas reações de aminotransferases, o α -cetoglutarato é oceptor do grupo amina. Todas as aminotransferases necessitam de piridoxal-fosfato (PLP) como cofator. Embora a reação esteja mostrada aqui no sentido da transferência do grupo amina para o α -cetoglutarato, ela é facilmente reversível.

Todas as aminotransferases apresentam o mesmo grupo prostético e o mesmo mecanismo de reação. O grupo prostético é o **piridoxal-fosfato (PLP)**, a forma de coenzima da piridoxina ou vitamina B₆. O piridoxal-fosfato já foi citado no Capítulo 15, como coenzima na reação da glicogênio-fosforilase, mas seu papel naquela reação não é representativo de sua função usual como coenzima. Seu principal papel nas células é o metabolismo de moléculas com grupos amina.

O piridoxal-fosfato funciona como carreador intermediário de grupos amina no sítio ativo das aminotransferases. Ele sofre transformações reversíveis entre sua forma aldeídica, o piridoxal-fosfato, que pode aceitar um grupo amina, e sua forma aminada, a piridoxamina-fosfato, que pode doar seu grupo amina para um α -cetoácido (Figura 18-5a). Em geral, o piridoxal-fosfato encontra-se ligado covalentemente ao sítio ativo da enzima por meio de uma ligação aldimina (base de Schiff) com o grupo épsilon-amino de um resíduo de Lys (Figura 18-5b, d).

O piridoxal-fosfato participa de uma variedade de reações nos carbonos α , β e γ (C-2 a C-4) de aminoácidos. Reações no carbono α (Figura 18-6) incluem racemizações (interconvertendo L e D-aminoácidos) e descarboxilações, assim como transaminações. O piridoxal-fosfato desempenha o mesmo papel químico em cada uma dessas reações. Uma ligação com o carbono α do substrato é rompida, removendo um próton ou um grupo carboxila. O par de elétrons que permanece no carbono α produziria um carbânion altamente instável, mas o piridoxal-fosfato fornece estabilização desse intermediário por ressonância (Figura 18-6, no detalhe). A estrutura altamente conjugada do PLP (escoadouro de elétrons) permite o deslocamento da carga negativa.

As aminotransferases (Figura 18-5) são exemplos clássicos de enzimas que catalisam reações bimoleculares de

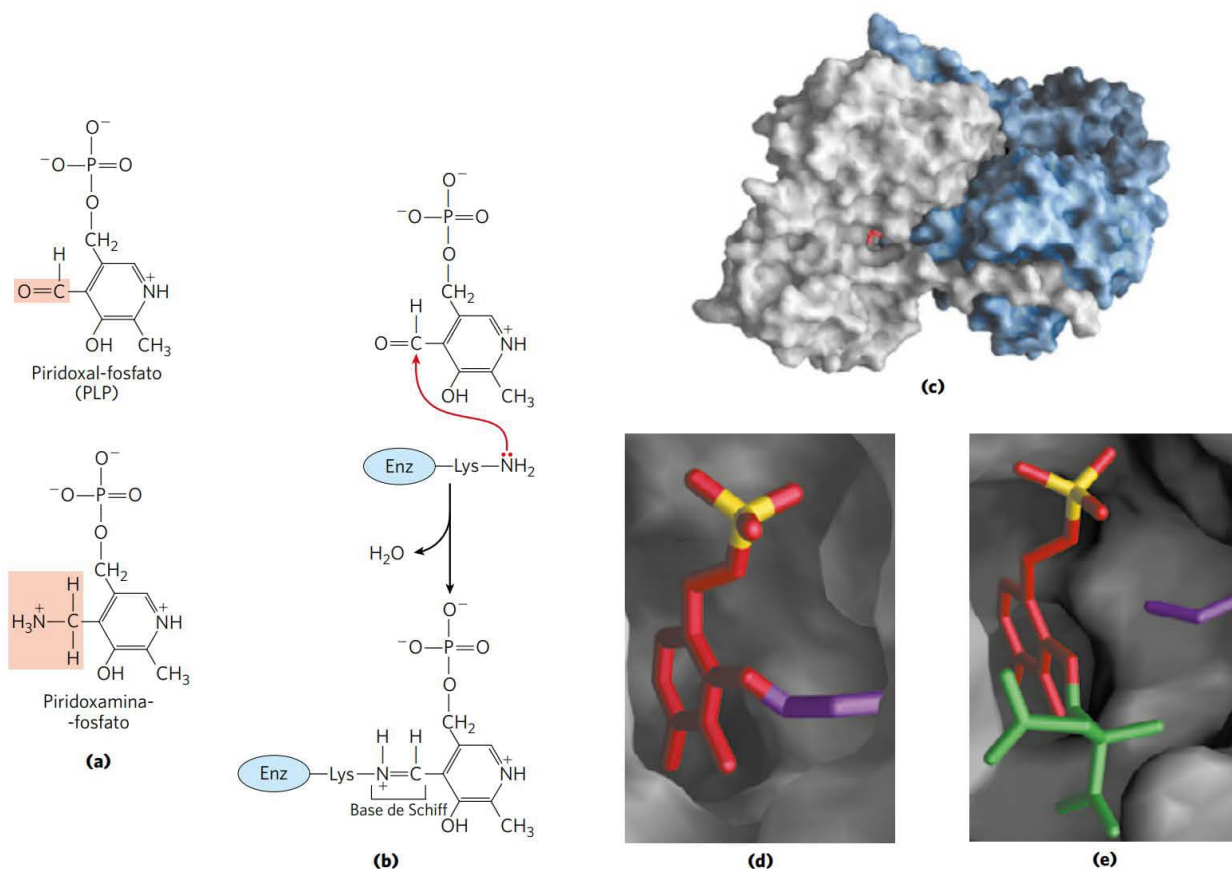


FIGURA 18-5 Piridoxal-fosfato, o grupo prostético das aminotransferases. (a) Piridoxal-fosfato (PLP) e sua forma aminada, piridoxamina-fosfato, são coenzimas fortemente ligadas às aminotransferases. Os grupos funcionais estão sombreados. (b) O piridoxal-fosfato está ligado à enzima por meio de interações não covalentes e pela formação de uma base de Schiff (aldimina) com um resíduo de Lys no sítio ativo. Os passos para a formação da base de Schiff a partir de uma amina primária e de um grupo carbonila estão detalhados na Figura 14-6. (c) PLP (em vermelho) ligado a um dos dois sítios ativos da enzima dimérica aspartato-aminotransferase, uma aminotransferase típica. (d) Visão do sítio ativo, com o PLP (em vermelho, com o fósforo em amarelo) em uma ligação aldimina com a cadeia lateral da Lys²⁵⁸ (em roxo). (e) Outra visão do sítio ativo, com o PLP ligado a um análogo do substrato, o 2-metilaspártato (em verde) por meio de uma base de Schiff. [Fonte: (c, d, e) PDB ID 1AJS, S. Rhee et al., *J. Biol. Chem.* 272:17,293, 1997]

pingue-pongue (ver Figura 6-13b, d), nas quais o primeiro substrato reage e o produto deve deixar o sítio ativo antes que o segundo substrato possa se ligar. Assim, o aminoácido liga-se ao sítio ativo, doa seu grupo amina ao piridoxal-fosfato e deixa o sítio ativo na forma de um α -cetoácido. O outro α -cetoácido, que funciona como substrato, liga-se então ao sítio ativo, aceita o grupo amina da piridoxamina-fosfato e deixa o sítio ativo na forma de um aminoácido.

O glutamato libera seu grupo amina na forma de amônia no fígado

Como foi visto, os grupos amina de muitos α -aminoácidos são coletados, no fígado, na forma do grupo amina de moléculas de L-glutamato. Esses grupos amina devem ser removidos do glutamato e preparados para excreção. Nos hepatócitos, o glutamato é transportado do citosol para a mitocôndria, onde sofre **desaminação oxidativa**, catalisada pela **L-glutamato-desidrogenase** (M_r 330.000).

Nos mamíferos, essa enzima está presente na matriz mitocondrial. É a única enzima que pode utilizar tanto NAD⁺ quanto NADP⁺ comoceptor de equivalentes redutores (**Figura 18-7**).

A ação combinada de uma aminotransferase e da glutamato-desidrogenase é conhecida como **transdesaminação**. Poucos aminoácidos contornam a via de transdesaminação e sofrem diretamente desaminação oxidativa. O destino do NH₄⁺ produzido por qualquer desses processos de desaminação é discutido em detalhes na Seção 18.2. O α -cetoglutarato formado a partir da desaminação do glutamato pode ser utilizado no ciclo do ácido cítrico e para a síntese de glicose.

A glutamato-desidrogenase opera em uma importante interseção do metabolismo do carbono e do nitrogênio. Essa enzima alostérica com seis subunidades idênticas tem sua atividade influenciada por um arranjo complicado de moduladores alostéricos. Os mais bem estudados são

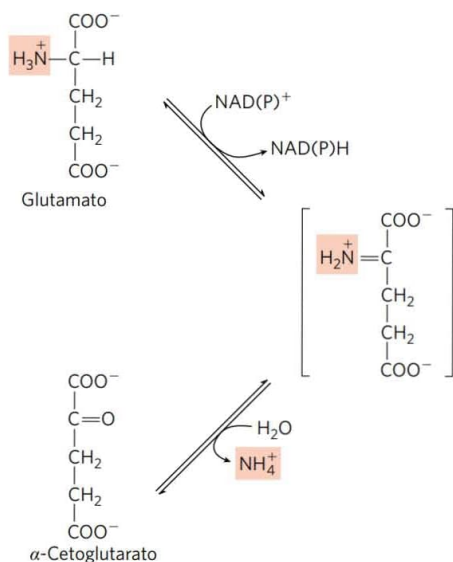


FIGURA 18-7 Reação catalisada pela glutamato-desidrogenase.

A glutamato-desidrogenase do fígado de mamíferos tem a capacidade incomum de utilizar tanto NAD^+ quanto NADP^+ como cofator. As glutamato-desidrogenase de plantas e microrganismos normalmente são específicas para um ou outro desses aceptores de elétrons. A enzima dos mamíferos é regulada alostericamente por GTP e ADP.

amônia livre é convertida em um composto não tóxico antes de ser exportada dos tecidos extra-hepáticos para o sangue e transportada até o fígado ou até os rins. Para essa função de transporte, o glutamato, essencial para o metabolismo *intracelular* do grupo amina, é suplantado pela L-glutamina. A amônia livre produzida nos tecidos combina-se com o glutamato, produzindo glutamina, pela ação da **glutamina-sintetase**. Essa reação requer ATP e ocorre em duas etapas (**Figura 18-8**). Inicialmente, o glutamato e o ATP reagem para formar ADP e um intermediário γ -glutamil-fosfato, que, então, reage com a amônia, produzindo glutamina e fosfato inorgânico. A glutamina é uma forma de transporte não tóxico para a amônia; ela normalmente está presente no sangue em concentrações muito maiores que os demais aminoácidos. A glutamina também serve como fonte de grupos amina em várias reações biossintéticas. A glutamina-sintetase é encontrada em todos os organismos, sempre desempenhando um papel metabólico central. Nos microrganismos, essa enzima serve como via de entrada essencial do nitrogênio fixado em sistemas biológicos. (Os papéis da glutamina e da glutamina-sintetase no metabolismo são discutidos no Capítulo 22.)

Na maioria dos animais terrestres, a glutamina que excede as necessidades de biossíntese é transportada pelo sangue para o intestino, o fígado e os rins para ser processada. Nesses tecidos, o nitrogênio amídico é liberado como íon amônio na mitocôndria, onde a enzima **glutaminase** converte glutamina a glutamato e NH_4^+ (**Figura 18-8**). O NH_4^+ do intestino e dos rins é transportado no sangue para o fígado. No fígado, a amônia de todas essas fontes é utilizada na síntese da ureia. Parte do glutamato produzido na reação da glutaminase pode ser adicionalmente processada no fígado

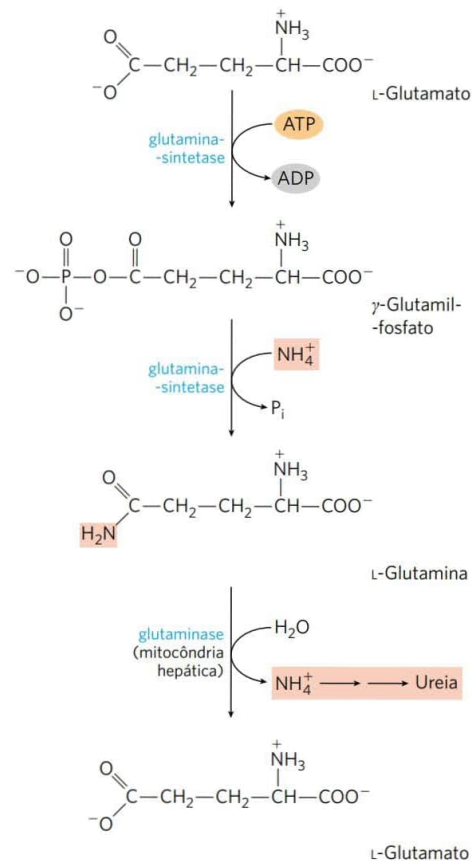


FIGURA 18-8 Transporte de amônia na forma de glutamina.

O excesso de amônia nos tecidos é adicionado ao glutamato para formar glutamina, um processo catalisado pela glutamina-sintetase. Após ser transportada pela corrente sanguínea, a glutamina entra no fígado, e o NH_4^+ é liberado na mitocôndria pela enzima glutaminase.

gado pela glutamato-desidrogenase, liberando mais amônia e produzindo esqueletos carbonados para utilização como combustível. Contudo, a maior parte do glutamato entra em reações de transaminação necessárias para a biossíntese de aminoácidos e para outros processos (Capítulo 22).



Na acidose metabólica (p. 670), há um aumento do processamento da glutamina pelos rins. Nem todo o excesso de NH_4^+ assim produzido é liberado para a corrente sanguínea ou convertido em ureia; parte é excretado diretamente na urina. No rim, o NH_4^+ forma sais com ácidos metabólicos, facilitando sua remoção na urina. O bicarbonato produzido pela descarboxilação do α -cetoglutarato no ciclo do ácido cítrico também pode funcionar como tampão no plasma sanguíneo. Tomados em conjunto, esses efeitos do metabolismo da glutamina no rim tendem a contrabalançar a acidose. ■

A alanina transporta a amônia dos músculos esqueléticos para o fígado

A alanina também desempenha um papel especial no transporte dos grupos amina para o fígado em uma forma não tóxica, por meio de uma via denominada **ciclo da gli-**

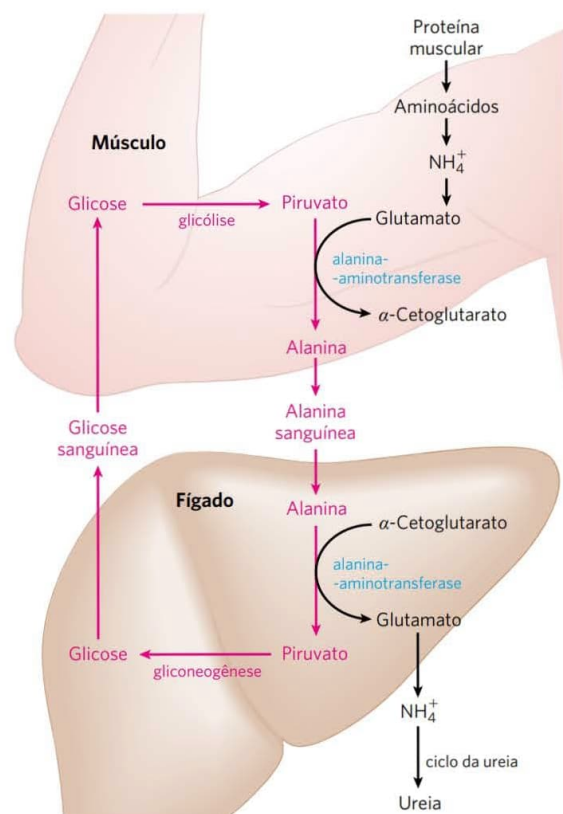


FIGURA 18-9 O ciclo da glicose-alanina. A alanina funciona como transportadora de amônia e do esqueleto carbonado do piruvato do músculo esquelético até o fígado. A amônia é excretada, e o piruvato é utilizado para produzir glicose, que é devolvida ao músculo.

cose-alanina (Figura 18-9). No músculo e em alguns outros tecidos que degradam aminoácidos como combustível, os grupos amina são coletados na forma de glutamato por transaminação (Figura 18-2a). O glutamato pode ser convertido em glutamina para transporte ao fígado, como descrito anteriormente, ou pode transferir seu grupo α -amina para o piruvato, produto da glicólise muscular facilmente disponível, pela ação da **alanina-aminotransferase** (Figura 18-9). A alanina assim produzida passa para o sangue e segue para o fígado. No citosol dos hepatócitos, a alanina-aminotransferase transfere o grupo amina da alanina para o α -cetoglutarato, formando piruvato e glutamato. O glutamato, então, entra na mitocôndria, onde a reação da glutamato-desidrogenase libera NH_4^+ (Figura 18-7), ou sofre transaminação com o oxalacetato para formar aspartato, outro doador de nitrogênio para a síntese de ureia, como veremos.

A utilização de alanina para o transporte da amônia dos músculos esqueléticos para o fígado é outro exemplo da economia intrínseca dos organismos vivos. Os músculos esqueléticos em contração vigorosa operam anaerobicamente, produzindo piruvato e lactato pela glicólise, assim como amônia pela degradação proteica. De algum modo, esses produtos devem chegar ao fígado, onde o piruvato e o lactato são incorporados na glicose, que volta aos músculos, e a

amônia é convertida em ureia para excreção. O ciclo da glicose-alanina, em conjunto com o ciclo de Cori (ver Quadro 14-2 e Figura 23-21), realiza essa operação. O custo energético da gliconeogênese é, assim, imposto ao fígado e não ao músculo, e todo o ATP disponível no músculo é destinado à contração muscular.

A amônia é tóxica para os animais



A produção catabólica de amônia impõe um sério problema bioquímico, por ser muito tóxica. O encéfalo é especialmente sensível; a lesão causada pela toxicidade da amônia causa prejuízos cognitivos, ataxia e crises epilépticas. Em casos extremos, há edema do encéfalo, levando à morte. As bases moleculares para essa toxicidade estão gradualmente sendo desvendadas. No sangue, cerca de 98% da amônia está na forma protonada (NH_4^+), que não cruza a membrana plasmática. A pequena quantidade de NH_3 presente cruza prontamente todas as membranas, incluindo a barreira hematoencefálica, permitindo a entrada de amônia nas células, onde boa parte dela se torna protonada e pode se acumular dentro da célula na forma de NH_4^+ .

A remoção do excesso de amônia presente no citosol requer a aminação redutora do α -cetoglutarato a glutamato pela glutamato-desidrogenase (no sentido inverso da reação descrita anteriormente; Figura 18-7) e a conversão de glutamato em glutamina pela glutamina-sintetase. No encéfalo, apenas os astrócitos — células em formato de estrela do sistema nervoso que fornecem nutrientes, suporte e isolamento para os neurônios — expressam a glutamina-sintetase. O glutamato e seu derivado, o γ -aminobutirato (GABA; ver Figura 22-31), são importantes neurotransmissores; parte da sensibilidade do encéfalo à amônia pode refletir uma depleção de glutamato na reação da glutamina-sintetase. A atividade da glutamina-sintetase, contudo, é insuficiente para lidar com o excesso de amônia, ou para explicar completamente sua toxicidade.

O aumento na $[\text{NH}_4^+]$ altera também a capacidade dos astrócitos de manter a homeostasia do potássio entre os dois lados da membrana. O NH_4^+ compete com o K^+ pelo transporte para dentro da célula via $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$, resultando em aumento na $[\text{K}^+]$ extracelular. O excesso de K^+ extracelular entra nos neurônios por meio de um simportador, o **cotransportador 1 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ (NKCC1)**, trazendo consigo Na^+ e 2Cl^- . O excesso de Cl^- nesses neurônios altera a resposta dessas células quando o neurotransmissor GABA interage com seus receptores GABA_A , produzindo despolarização anormal e aumento da atividade neuronal, o que provavelmente explica a falta de coordenação neuromuscular e as crises que frequentemente resultam do envenenamento por amônia. Se a $[\text{NH}_4^+]$ extracelular continua elevada, a perturbação de canais iônicos e de aquaporina nos astrócitos determina edema celular, resultando em edema encefálico fatal. ■

Ao concluir esta discussão a respeito do metabolismo do grupo amina, observe que foram descritos diversos processos que depositam o excesso de amônia na mitocôndria dos hepatócitos (Figura 18-2). Agora, será estudado o destino dessa amônia.

RESUMO 18.1 Destinos metabólicos dos grupos amina

- Os seres humanos obtêm uma pequena fração de sua energia oxidativa a partir do catabolismo dos aminoácidos. Os aminoácidos provêm da degradação normal de proteínas celulares (reciclagem), da degradação de proteínas da dieta e da degradação de proteínas teciduais no lugar de outros combustíveis durante o jejum ou no diabetes melito não controlado.
- As proteases degradam as proteínas da dieta no estômago e no intestino delgado. A maioria das proteases é primeiramente sintetizada como zimogênios inativos.
- A primeira etapa no catabolismo dos aminoácidos é separar o grupo amina do esqueleto carbonado. Na maior parte dos casos, o grupo amina é transferido para o α -cetoglutarato, formando glutamato. Essa reação de transaminação requer a coenzima piridoxal-fosfato.
- O glutamato é transportado à mitocôndria hepática, onde a glutamato-desidrogenase libera o grupo amina na forma de íon amônio (NH_4^+). A amônia produzida em outros tecidos é transportada ao fígado como o nitrogênio amídico da glutamina ou, no transporte a partir do músculo esquelético, como o grupo amina da alanina.
- O piruvato produzido pela desaminação da alanina no fígado é convertido em glicose, a qual é transportada de volta ao músculo como parte do ciclo da glicose-alanina.

18.2 Excreção de nitrogênio e ciclo da ureia

Se não forem reutilizados para a síntese de novos aminoácidos ou de outros produtos nitrogenados, os grupos amina são canalizados em um único produto final de excreção (**Figura 18-10**). A maioria das espécies aquáticas, como os peixes ósseos, é **amoniotética** e excreta o nitrogênio amínico como amônia. A amônia tóxica é simplesmente diluída na água do ambiente. Os animais terrestres necessitam de vias para a excreção do nitrogênio que minimizem a toxicidade e a perda de água. A maior parte dos animais terrestres é **ureotética** e excreta o nitrogênio amínico na forma de ureia; aves e répteis são **uricotéticos** e excretam o nitrogênio amínico como ácido úrico. (A via de síntese do ácido úrico é descrita na Figura 22-48.) As plantas reciclam praticamente todos os grupos amina, e a excreção de nitrogênio ocorre apenas em circunstâncias muito incomuns.

Nos organismos ureotéticos, a amônia depositada na mitocôndria dos hepatócitos é convertida em ureia no **ciclo da ureia**. Essa via foi descoberta em 1932 por Hans Krebs (que mais tarde também descobriu o ciclo do ácido cítrico) e seu colaborador Kurt Henseleit, estudante de medicina. A produção de ureia ocorre quase exclusivamente no fígado, sendo o destino da maior parte da amônia canalizada para esse órgão. A ureia passa para a circulação sanguínea e chega aos rins, sendo excretada na urina. A produção de ureia é agora o foco desta discussão.

A ureia é produzida a partir da amônia por meio de cinco etapas enzimáticas

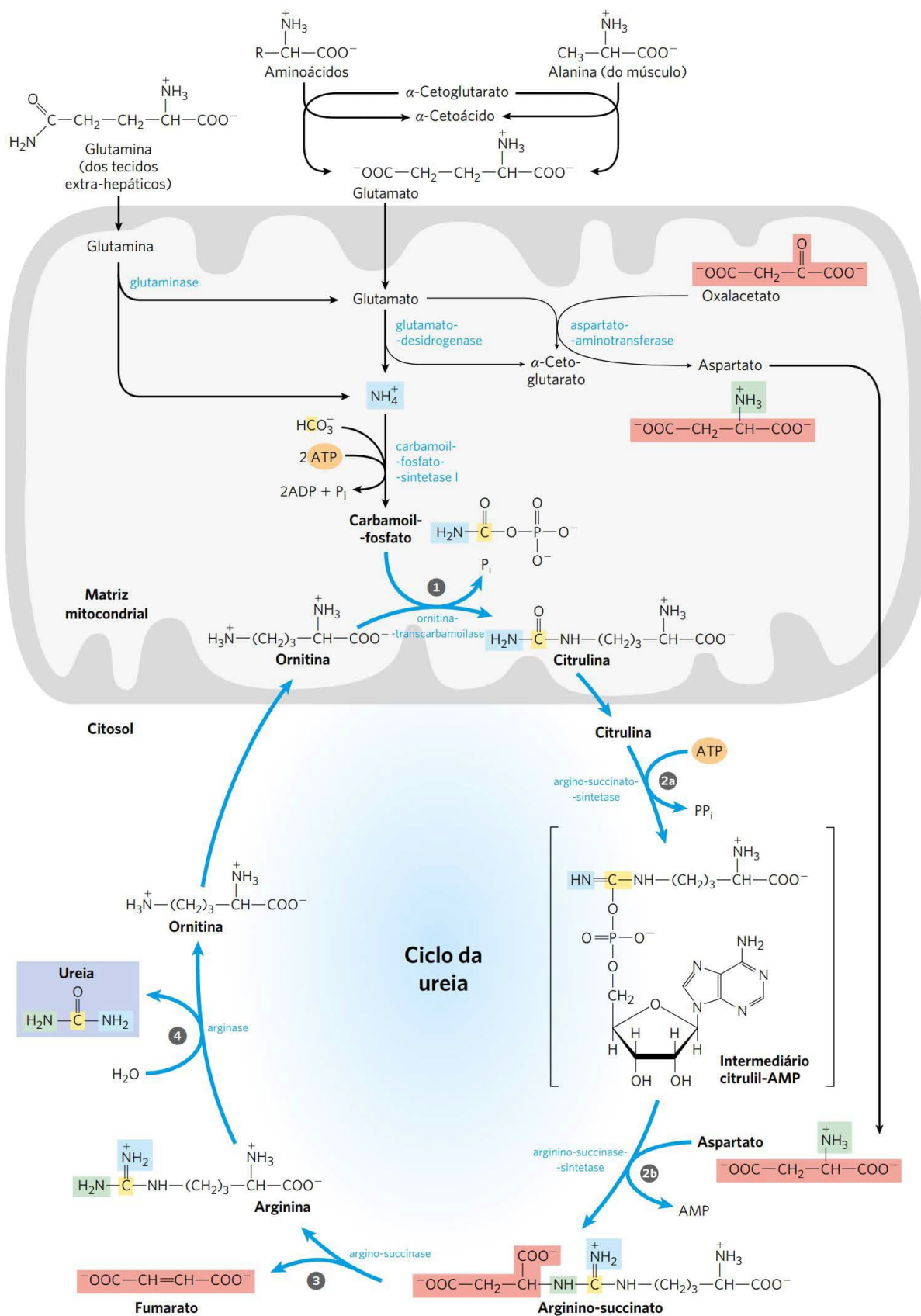
O ciclo da ureia inicia dentro da mitocôndria hepática, mas três de suas etapas seguintes ocorrem no citosol; o ciclo, as-

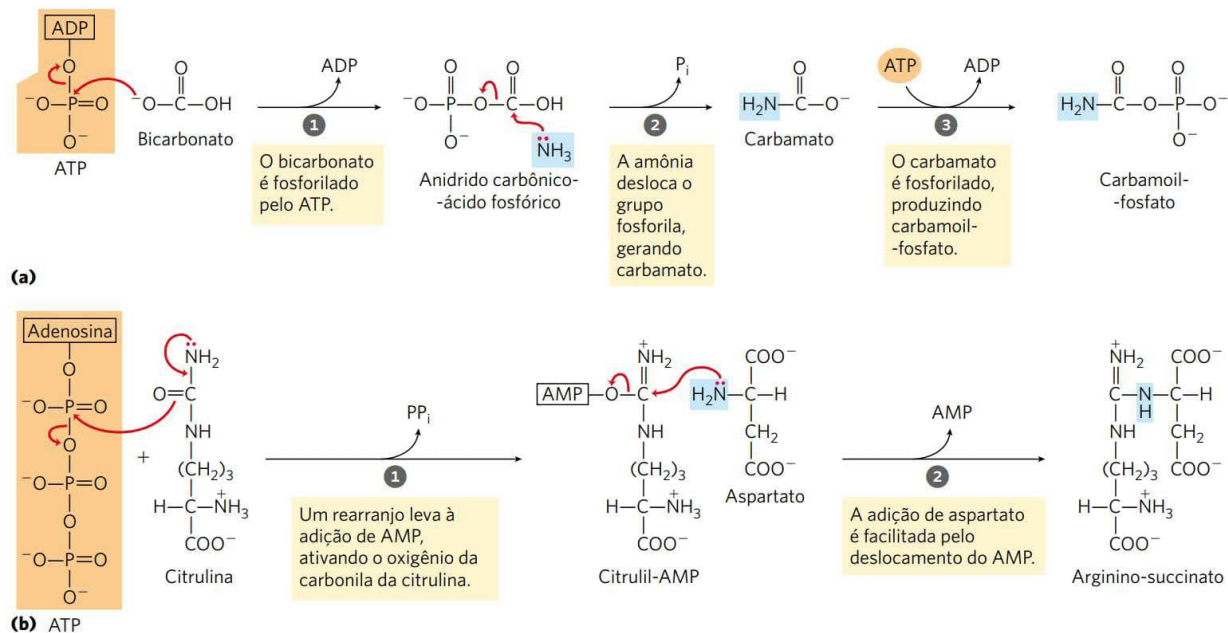
sim, abrange dois compartimentos celulares (**Figura 18-10**). O primeiro grupo amina que entra no ciclo da ureia é derivado da amônia na matriz mitocondrial – a maior parte desse NH_4^+ é fornecida pelas vias descritas anteriormente. O fígado também recebe parte da amônia pela veia porta, sendo essa amônia produzida no intestino pela oxidação de aminoácidos por bactérias. Qualquer que seja sua fonte, o NH_4^+ presente na mitocôndria hepática é utilizado imediatamente, juntamente com o CO_2 (como HCO_3^-) produzido pela respiração mitocondrial, para formar carbamoil-fosfato na matriz (**Figura 18-11a**; ver também **Figura 18-10**). Essa reação é dependente de ATP, sendo catalisada pela **carbamoil-fosfato-sintetase I**, uma enzima regulatória (ver a seguir). A forma mitocondrial da enzima é diferente da forma citosólica (II), a qual tem uma função distinta na biossíntese das pirimidinas (**Capítulo 22**).

O carbamoil-fosfato, que funciona como doador ativado de grupos carbamoila, entra no ciclo da ureia. O ciclo tem apenas quatro etapas enzimáticas. Primeiro, o carbamoil-fosfato doa seu grupo carbamoila para a ornitina, formando citrulina, com a liberação de P_i (**Figura 18-10**, etapa 1). A reação é catalisada pela **ornitina-transcarbamoilase**. A ornitina não é um dos 20 aminoácidos encontrados nas proteínas, mas é um intermediário-chave no metabolismo do nitrogênio. Ela é sintetizada a partir do glutamato em uma via com cinco etapas, descrita no **Capítulo 22**. A ornitina desempenha um papel que se assemelha àquele do oxalacetato no ciclo do ácido cítrico, aceitando material a cada volta do ciclo da ureia. A citrulina produzida no primeiro passo do ciclo da ureia passa da mitocôndria para o citosol.

Os próximos dois passos trazem o segundo grupo amina. A fonte é o aspartato produzido na mitocôndria por transaminação e transportado para o citosol. A reação de condensação entre o grupo amina do aspartato e o grupo ureido (carbonila) da citrulina forma arginino-succinato (etapa 2 na **Figura 18-10**). Essa reação citosólica, catalisada pela **arginino-succinato-sintetase**, requer ATP e ocorre via um intermediário citrullil-AMP (**Figura 18-11b**). O arginino-succinato é, então, clivado pela **arginino-succinase** (etapa 3 na **Figura 18-10**), formando arginina e fumarato; este último é convertido em malato e a seguir entra na mitocôndria para unir-se aos intermediários do ciclo do ácido cítrico. Esse passo é a única reação reversível do ciclo da ureia. Na última etapa do ciclo (etapa 4), a enzima citosólica **arginase** cliva a arginina, produzindo **ureia** e

FIGURA 18-10 O ciclo da ureia e as reações que fornecem grupos amina para o ciclo. As enzimas que catalisam essas reações (cujos nomes aparecem no texto) estão distribuídas entre a matriz mitocondrial e o citosol. Um grupo amina entra no ciclo da ureia como carbamoil-fosfato, formado na matriz; o outro entra como aspartato, produzido na matriz pela transaminação entre oxalacetato e glutamato, catalisada pela aspartato-aminotransferase. O ciclo da ureia consiste em quatro passos. 1 Formação de citrulina a partir de ornitina e carbamoil-fosfato (entrada do primeiro grupo amina); a citrulina passa para o citosol. 2 Produção de arginino-succinato, via um intermediário citrullil-AMP (entrada do segundo grupo amina). 3 Formação da arginina a partir do arginino-succinato; essa reação libera fumarato, que entra no ciclo do ácido cítrico. 4 Formação de ureia; esta reação também regenera a ornitina. As vias pelas quais o NH_4^+ chega à matriz mitocondrial dos hepatócitos foram discutidas na Seção 18.1.





MECANISMO-FIGURA 18-11 Reações que captam nitrogênio no ciclo da ureia. Os átomos de nitrogênio da ureia são obtidos por meio de duas reações que necessitam de ATP. **(a)** Na reação catalisada pela carbamoil-fosfato-sintetase I, entra o primeiro átomo de nitrogênio, sob a forma de amônia. Os grupos fosfato terminais de duas moléculas de ATP são utilizados para formar uma molécula de carbamoil-fosfato. Em outras palavras, essa reação apresenta dois passos de ativação (1 e 3). **(b)** Na reação catalisada pela arginino-succinato-sintetase, o segundo nitrogênio entra no ciclo a partir do aspartato. A ativação do oxigênio do grupo ureídico da citrulina no passo 1 prepara o composto para a adição do aspartato, no passo 2.

ornitina. A ornitina é transportada para a mitocôndria para iniciar outra volta do ciclo da ureia.

Como observado no Capítulo 16, as enzimas de muitas vias metabólicas encontram-se agrupadas em metabolons (p. 642), com o produto de uma reação enzimática sendo canalizado diretamente para a próxima enzima da via. No ciclo da ureia, as enzimas mitocondriais e citosólicas parecem estar agrupadas dessa forma. A citrulina transportada para fora da mitocôndria não é diluída no conjunto geral de metabólitos no citosol, mas passa diretamente para o sítio ativo da arginino-succinato-sintetase. Essa canalização entre enzimas continua para o arginino-succinato, a arginina e a ornitina. Apenas a ureia é liberada para o conjunto geral de metabólitos no citosol.

Os ciclos do ácido cítrico e da ureia podem estar ligados

Uma vez que o fumarato produzido na reação da arginino-succinase também é um intermediário do ciclo do ácido cítrico, os ciclos estão, a princípio, interconectados – em processo apelidado de “bicicleta de Krebs” (**Figura 18-12**). Contudo, cada ciclo opera independentemente e a comunicação entre eles depende do transporte de intermediários-chave entre a mitocôndria e o citosol. Os principais transportadores na membrana interna da mitocôndria incluem o transportador malato- α -cetoglutarato, o transportador glutamato-aspartato e o transportador glutamato- OH^- . Juntos, esses transportadores facilitam o movimento do malato e do glutamato para dentro da matriz mitocondrial e o movimento do aspartato e do α -cetoglutarato para fora da mitocôndria, rumo ao citosol.

Diversas enzimas do ciclo do ácido cítrico, incluindo a fumarase (fumarato-hidratase) e a malato-desidrogenase (p. 633), também estão presentes como isoenzimas no citosol. Não há um transportador para levar diretamente o fumarato gerado na síntese de arginina no citosol para a matriz mitocondrial. Contudo, o fumarato pode ser convertido em malato no citosol. Fumarato e malato podem ser metabolizados no citosol ou o malato pode ser transportado para o interior da mitocôndria, para utilização no ciclo do ácido cítrico. O aspartato formado na mitocôndria por transaminação entre o oxalacetato e o glutamato pode ser transportado para o citosol, onde atua como doador de nitrogênio na reação do ciclo da ureia catalisada pela arginino-succinato-sintetase. Essas reações, que constituem a **lançadeira aspartato-arginino-succinato**, fornecem elos metabólicos entre essas vias separadas, pelos quais os grupos amina e os esqueletos carbonados dos aminoácidos são processados.

O uso do aspartato como doador de nitrogênio no ciclo da ureia pode parecer uma forma relativamente complicada de introduzir o segundo grupo amina na ureia. Contudo, será visto no Capítulo 22 que essa via para a incorporação do nitrogênio é uma das duas formas mais comuns de introduzir grupos amina em biomoléculas. No ciclo da ureia, outras interconexões entre vias podem ajudar a explicar a razão pela qual o aspartato é utilizado como doador de nitrogênio. Os ciclos da ureia e do ácido cítrico estão fortemente unidos a um processo adicional, que traz o NADH na forma de equivalentes redutores para dentro da mitocôndria. Como detalhado no próximo capítulo, o NADH produzido

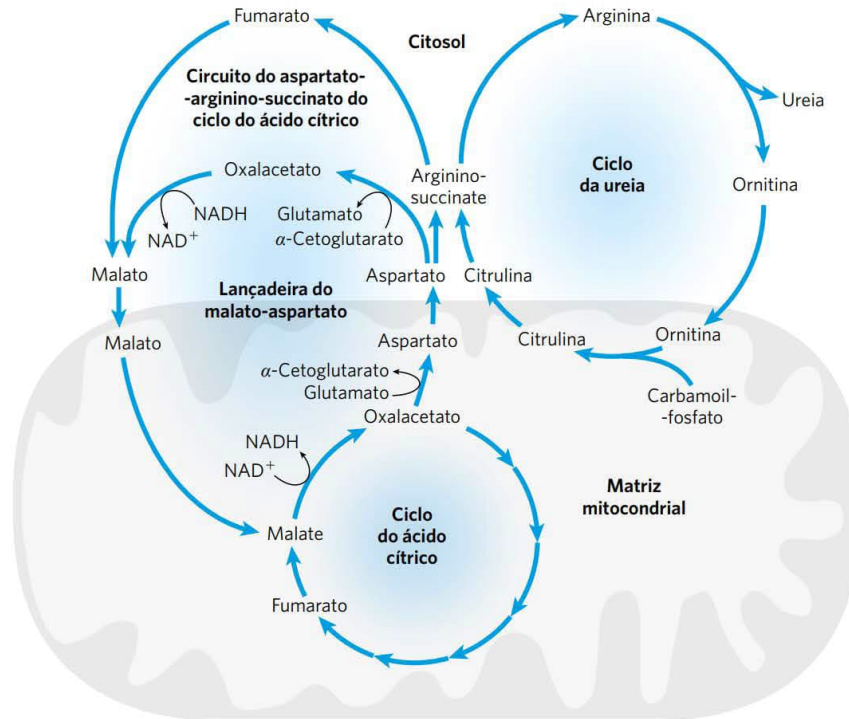


FIGURA 18-12 Vínculos entre o ciclo da ureia e o ciclo do ácido cítrico. Esses dois ciclos interconectados têm sido denominados “bicicleta de Krebs”. As reações que unem o ciclo do ácido cítrico ao ciclo da ureia são conhecidas como a lançadeira do aspartato-arginino-succinato; elas unem efetivamente os destinos dos grupos amina e dos esqueletos carbonados dos aminoácidos. As interconexões são bastante elaboradas. Por exemplo, algumas enzimas do ciclo do ácido cítrico, como a fumarase e a malato-desidrogenase, apresentam isoenzimas citosólicas e mitocondriais. O fumarato produzido no citosol, seja no ciclo da ureia, na biossíntese de purinas ou em outros processos, pode ser convertido em malato citosólico, que, por sua vez, é utilizado no citosol ou transportado para a mitocôndria para entrar no ciclo do ácido cítrico. Esses processos são, ainda, interligados com a lançadeira do malato-aspartato, um conjunto de reações que traz equivalentes redutores para a mitocôndria (ver também Figura 19-31). Esses diferentes ciclos ou processos contam com um número limitado de transportadores na membrana mitocondrial interna.

pela glicólise, pela oxidação de ácidos graxos e em outros processos não pode ser transportado através da membrana mitocondrial interna. Contudo, equivalentes redutores podem entrar na mitocôndria pela conversão de aspartato em oxalacetato no citosol, seguindo-se a redução do oxalacetato a malato pelo NADH. O malato é, então, transportado para a matriz mitocondrial via transportador malato- α -cetoglutarato. Uma vez dentro da mitocôndria, o malato pode ser convertido novamente em oxalacetato, ao mesmo tempo em que gera NADH. O oxalacetato é convertido em aspartato na matriz e transportado para fora da mitocôndria pelo transportador aspartato-glutamato. Essa lançadeira de elétrons malato-aspartato completa um novo ciclo, que funciona mantendo a mitocôndria com suprimento de NADH (Figura 18-12; ver também Figura 19-31).

Esses processos exigem que as concentrações de glutamato e aspartato sejam mantidas em equilíbrio no citosol. A enzima que transfere grupos amina entre esses dois aminoácidos-chave é a aspartato-aminotransferase, AST (também chamada de transaminase glutâmico-oxalacética, TGO). Essa enzima está entre as mais ativas enzimas nos hepatócitos e em outros tecidos. Quando ocorre lesão tecidual, essa enzima (cuja atividade é facilmente mensurável) e outras vazam para a circulação sanguínea. Assim, a avaliação dos níveis sangüí-

neos de enzimas hepáticas é importante para o diagnóstico de várias condições médicas (Quadro 18-1).

A atividade do ciclo da ureia é regulada em dois níveis

O fluxo de nitrogênio no ciclo da ureia em determinado animal varia com a dieta. Quando a ingestão dietética é basicamente proteica, os esqueletos carbonados dos aminoácidos são utilizados como combustível, produzindo muita ureia a partir dos grupos amina excedentes. Durante o jejum prolongado, quando a degradação de proteína muscular começa a suprir boa parte da energia metabólica do organismo, a produção de ureia também aumenta significativamente.

Essas alterações de demanda com relação à atividade do ciclo da ureia são realizadas, em longo prazo, pela regulação das velocidades de síntese das quatro enzimas do ciclo da ureia e da carbamoi-fosfato-sintetase I, no fígado. Essas cinco enzimas são sintetizadas em taxas mais altas em animais em jejum e em animais com dietas de alto conteúdo proteico, em comparação a animais alimentados cujas dietas contenham principalmente carboidratos e gorduras. Os animais com dietas desprovidas de proteínas produzem níveis mais baixos das enzimas do ciclo da ureia.

Em uma escala de tempo mais curta, a regulação alostérica de pelo menos uma enzima-chave ajusta o fluxo pelo

QUADRO 18-1



MEDICINA

Ensaio para avaliar lesão tecidual

A análise de certas atividades enzimáticas no soro sanguíneo fornece informações valiosas para o diagnóstico de diversas condições patológicas.

A alanina-aminotransferase (ALT; também denominada transaminase glutâmico-pirúvica, TGP) e a aspartato-aminotransferase (AST; também denominada transaminase glutâmico-oxalacética, TGO) são importantes para o diagnóstico de lesões cardíacas ou hepáticas causadas por infarto do miocárdio, toxicidade por drogas ou infecções. Após um infarto, várias enzimas, incluindo essas transaminases, “vazam” das células cardíacas lesionadas para a corrente sanguínea. Medidas das atividades séricas dessas duas transaminases pelos testes STGP e STGO (S, de soro) – e de outra enzima, a **creatina-cinase**, pelo teste SCK – podem fornecer informações sobre a gravidade da lesão. A creatina-cinase é a primeira enzima cardíaca a aparecer no sangue após um infarto; ela também desaparece rapidamente do sangue. A TGO é a próxima

a surgir, e a TGP aumenta posteriormente. A lactato-desidrogenase também pode vazar do músculo cardíaco lesionado ou anaeróbico.

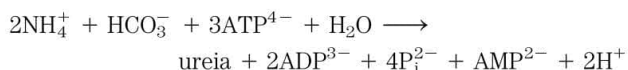
Esses testes (STGP e STGO) de avaliação das atividades das transaminases no soro também são importantes em medicina ocupacional, para se determinar se pessoas expostas a tetracloreto de carbono, clorofórmio ou outros solventes industriais sofreram lesão hepática. A degeneração hepática causada por esses solventes é acompanhada pelo surgimento de várias atividades enzimáticas no sangue, originárias dos hepatócitos lesionados. As aminotransferases são muito úteis no monitoramento de pessoas expostas a essas substâncias químicas, pois essas atividades enzimáticas são altas no fígado e, assim, provavelmente estarão entre as proteínas liberadas dos hepatócitos lesionados; além disso, elas podem ser detectadas no sangue em quantidades muito pequenas.

ciclo da ureia. A primeira enzima da via, a carbamoil-fosfato-sintetase I, é ativada alostericamente por **N-acetil-glutamato**, sintetizado a partir de acetil-CoA e glutamato pela **N-acetil-glutamato-sintase** (Figura 18-13). Em vegetais e microrganismos, essa enzima catalisa a primeira etapa na síntese *de novo* de arginina a partir do glutamato (ver Figura 22-12), mas, nos mamíferos, a atividade da N-acetil-glutamato-sintase no fígado exerce função

puramente reguladora (os mamíferos não têm as demais enzimas necessárias para a conversão de glutamato em arginina). Os níveis estacionários de N-acetil-glutamato são determinados pelas concentrações de glutamato e acetil-CoA (os substratos da N-acetil-glutamato-sintase) e arginina (ativador da N-acetil-glutamato-sintase e, portanto, ativador do ciclo da ureia).

A interconexão de vias reduz o custo energético da síntese da ureia

Analisando o ciclo da ureia isoladamente, percebe-se que a síntese de uma molécula de ureia requer a hidrólise de quatro ligações fosfato ricas em energia (Figura 18-10). Duas moléculas de ATP são necessárias na formação do carbamoil-fosfato e um ATP para produzir arginino-succinato – este último ATP sendo clivado em AMP e PP_i, que é hidrolisado em 2 P_i. A equação geral do ciclo da ureia é



Contudo, esse aparente custo é compensado pelas interconexões de vias detalhadas acima. O fumarato, gerado pelo ciclo da ureia, é convertido em malato, o qual é transportado para dentro da mitocôndria (Figura 18-12). Dentro da matriz mitocondrial, NADH é gerado na reação da malato-desidrogenase. Cada molécula de NADH pode gerar até 2,5 ATP durante a respiração mitocondrial (Capítulo 19), reduzindo muito o custo energético geral da síntese de ureia.

Defeitos genéticos do ciclo da ureia podem ser fatais



Pessoas com defeitos genéticos em qualquer das enzimas envolvidas na formação de ureia não toleram dietas ricas em proteína. Os aminoácidos ingeridos em excesso, além das necessidades mínimas diárias para a síntese

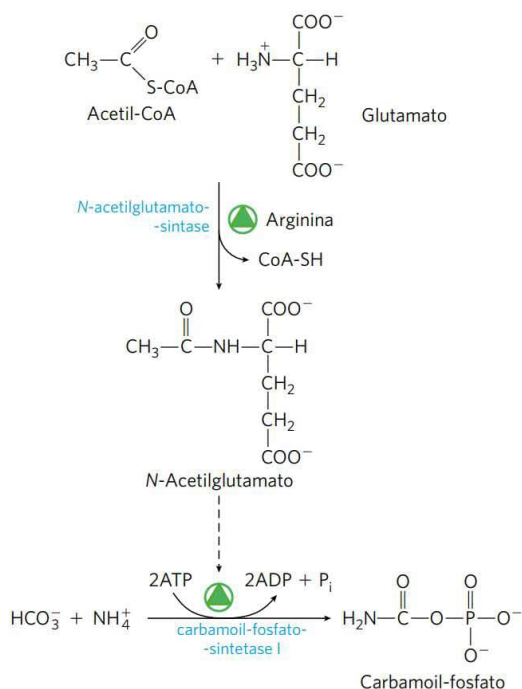


FIGURA 18-13 Síntese de N-acetilglutamato e ativação da carbamoil-fosfato-sintetase I por esse composto.

proteica, são desaminados no fígado, produzindo amônia livre, que não pode ser convertida em ureia para ser exportada para a corrente sanguínea e, como já foi frisado, a amônia é altamente tóxica. A ausência de uma enzima do ciclo da ureia pode resultar em hiperamonemia ou no aumento de um ou mais intermediários do ciclo da ureia, dependendo da enzima que estiver faltando. Uma vez que a maioria das etapas do ciclo da ureia é irreversível, a ausência de uma atividade enzimática frequentemente pode ser identificada pela determinação de qual intermediário do ciclo está presente em concentrações especialmente altas no sangue e/ou na urina. Embora a degradação dos aminoácidos possa apresentar sérios problemas para a saúde das pessoas com deficiências no ciclo da ureia, uma dieta desprovida de proteínas não é uma opção de tratamento. Os seres humanos são incapazes de sintetizar metade dos vinte aminoácidos proteicos, e esses **aminoácidos essenciais** (Tabela 18-1) devem estar presentes na dieta.

Uma variedade de tratamentos é disponibilizada para pessoas com defeitos no ciclo da ureia. A administração cuidadosa na dieta dos ácidos aromáticos benzoato ou fenilbutirato pode ajudar a diminuir os níveis de amônia no sangue. O benzoato é convertido em benzoil-CoA, que se combina com a glicina, formando hipurato (Figura 18-14, à esquerda). A glicina utilizada nessa reação deve ser regenerada, e a amônia é captada pela reação da glicina-sintase. O fenilbutirato é convertido em fenilacetato pela β -oxidação. O fenilacetato é, então, convertido em fenilacetil-CoA, que se combina com a glutamina, formando fenilacetilglutamina (Figura 18-14, à direita). A resultante remoção de glutamina desencadeia um aumento em sua síntese pela glutamina-sintetase (ver Equação 22-1), em uma reação que capta amônia. Tanto o hipurato quanto a fenilacetilglutamina são compostos não tóxicos e são excretados na urina. As vias mostradas na Figura 18-14 constituem apenas contribuições secundárias ao metabolismo normal, mas se tornam proeminentes quando ácidos aromáticos são ingeridos.

TABELA 18-1 Aminoácidos essenciais e não essenciais para seres humanos e para ratos albinos

Não essenciais	Essenciais condicionais ^a	Essenciais
Alanina	Arginina	Histidina
Asparagina	Cisteína	Isoleucina
Aspartato	Glutamina	Leucina
Glutamato	Glicina	Lisina
Serina	Prolina	Metionina
	Tirosina	Fenilalanina
		Treonina
		Triptofano
		Valina

^aNecessários em certo grau para animais jovens, em crescimento e/ou durante certas patologias.

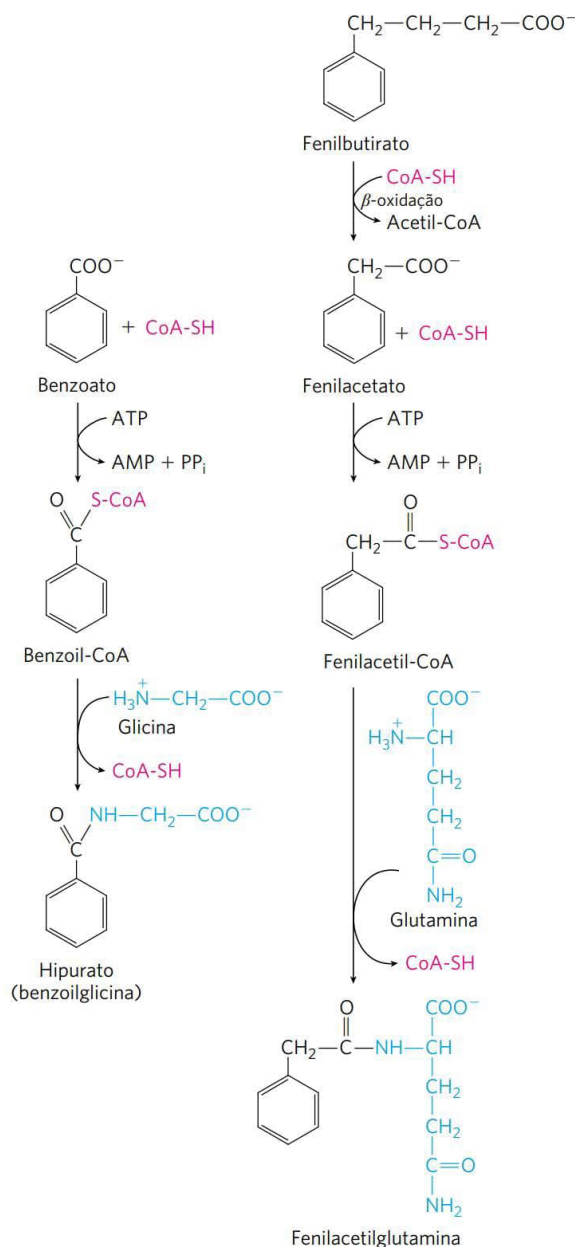
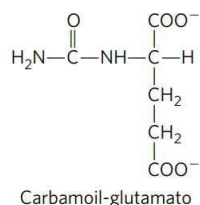


FIGURA 18-14 Tratamento para deficiências em enzimas do ciclo da ureia.

Os ácidos aromáticos benzoico e fenilbutírico, administrados na dieta, são metabolizados e se combinam com a glicina e com a glutamina, respectivamente. Os produtos são excretados na urina. A síntese subsequente de glicina e de glutamina para repor esses intermediários remove a amônia da corrente sanguínea.

Outras terapias são mais específicas para determinada deficiência enzimática. A deficiência de *N*-acetilglutamato-sintetase resulta na ausência do ativador normal para a carbamoil-fosfato-sintetase I (Figura 18-13). Essa condição pode ser tratada pela administração de carbamoil-glutamato, um análogo do *N*-acetilglutamato, que ativa efetivamente a carbamoil-fosfato-sintetase I.



A suplementação da dieta com arginina é útil no tratamento de deficiências de ornitina-transcarbamoilase, arginino-succinato-sintetase e arginino-succinase. Muitos desses tratamentos devem ser acompanhados por controle dietético rígido e suplementação de aminoácidos essenciais. Nos raros casos de deficiência de arginase, a arginina, substrato da enzima defeituosa, deve ser suprimida da dieta. ■

RESUMO 18.2 Excreção de nitrogênio e o ciclo da ureia

- A amônia é altamente tóxica para os tecidos animais. No ciclo da ureia, a ornitina combina-se com a amônia, na forma de carbamoil-fosfato, para formar citrulina. Um segundo grupo amino é transferido para a citrulina a partir do aspartato, para formar arginina – o precursor imediato da ureia. A arginase catalisa a hidrólise da arginina em ureia e ornitina; assim, a ornitina é regenerada a cada volta do ciclo.

- O ciclo da ureia resulta na conversão líquida de oxalacetato em fumarato, ambos intermediários do ciclo do ácido cítrico. Desse modo, os dois ciclos estão interconectados.
- A atividade do ciclo da ureia é regulada no nível de síntese de suas enzimas e por regulação alostérica da enzima que catalisa a formação de carbamoil-fosfato.

18.3 Vias da degradação dos aminoácidos

As vias do catabolismo dos aminoácidos, em conjunto, representam normalmente apenas 10 a 15% da produção de energia no organismo humano; essas vias são bem menos ativas que a glicólise e a oxidação dos ácidos graxos. O fluxo ao longo das vias catabólicas também varia muito, dependendo do equilíbrio entre as necessidades para processos biossintéticos e a disponibilidade de determinado aminoácido. As 20 vias catabólicas convergem para formar apenas seis produtos principais, os quais podem entrar no ciclo do ácido cítrico (**Figura 18-15**). Desse ponto, os esqueletos carbonados tomam vias distintas, sendo direcionados para a gliconeogênese ou para a cetogênese, ou oxidados completamente a CO_2 e H_2O .

Sete dos aminoácidos podem ter seus esqueletos carbonados, total ou parcialmente, degradados para produzir acetil-CoA. Cinco aminoácidos são convertidos em

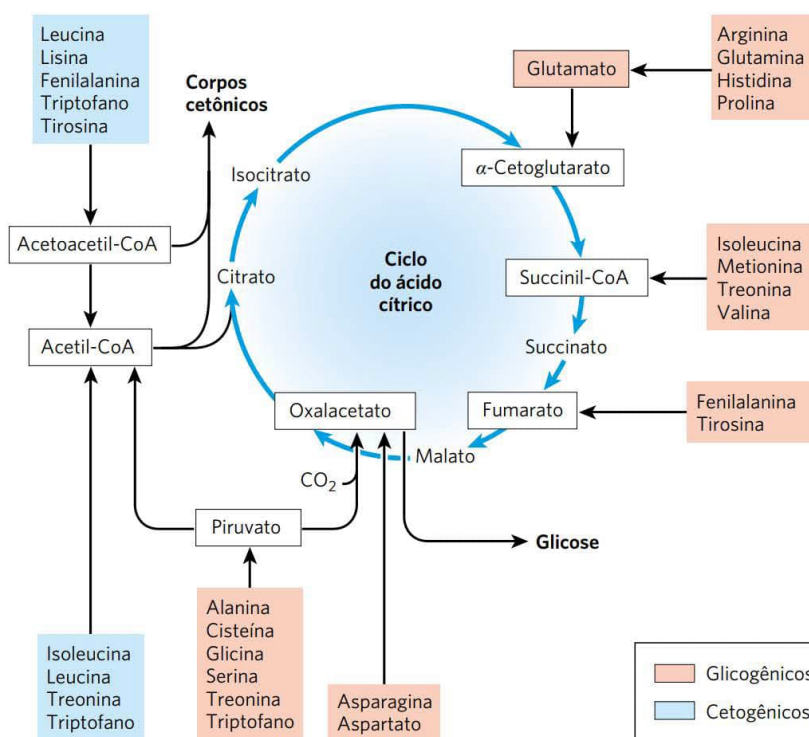


FIGURA 18-15 Resumo do catabolismo dos aminoácidos. Os aminoácidos estão agrupados conforme seu principal produto final de degradação. Alguns aminoácidos estão listados mais de uma vez, pois diferentes partes de seus esqueletos carbonados são degradadas em diferentes produtos finais. A figura mostra as vias catabólicas mais importantes em vertebrados; há, contudo, variações menores entre diferentes espécies de vertebrados. A treonina, por exemplo, é degradada por, no mínimo, duas vias diferentes (ver Figuras 18-19 e 18-27), e a importância de determinada via pode variar com o organismo e suas condições metabólicas. Aminoácidos glicogênicos e cetogênicos também estão delineados na figura, sombreados em cores. Observe que cinco aminoácidos são tanto glicogênicos quanto cetogênicos. Os aminoácidos que produzem piruvato também são potencialmente cetogênicos. Apenas dois aminoácidos, lisina e leucina, são exclusivamente cetogênicos.

α -cetoglutarato, quatro em succinil-CoA, dois em fumarato e dois em oxalacetato. Seis aminoácidos têm seu esqueleto carbonado, total ou parcialmente, convertido em piruvato, o qual pode ser transformado em acetil-CoA ou em oxalacetato. Posteriormente, serão resumidas as vias individuais para os 20 aminoácidos em diagramas de fluxo, cada um levando a um ponto específico de entrada no ciclo do ácido cítrico. Nesses diagramas, os átomos de carbono que entram no ciclo do ácido cítrico são mostrados coloridos. Observe que alguns aminoácidos aparecem mais de uma vez, refletindo diferentes destinos para diferentes partes de seus esqueletos carbonados. Em vez de examinar cada etapa de cada via no catabolismo dos aminoácidos, serão destacadas para uma discussão especial algumas reações enzimáticas de relevância particular, devido a seus mecanismos ou seu significado médico.

Alguns aminoácidos são convertidos em glicose, outros em corpos cetônicos

Os sete aminoácidos, inteira ou parcialmente, degradados em acetoacetil-CoA e/ou acetil-CoA – fenilalanina, tirosina, isoleucina, leucina, triptofano, treonina e lisina – podem produzir corpos cetônicos no fígado, onde a acetoacetil-CoA é convertida em acetoacetato e, então, em acetona e β -hidroxibutirato (ver Figura 17-18). Estes são aminoácidos **cetogênicos** (Figura 18-15). Sua capacidade de produzir corpos cetônicos é especialmente evidente no diabetes melito não controlado, quando o fígado produz grandes quantidades de corpos cetônicos a partir de ácidos graxos e de aminoácidos cetogênicos.

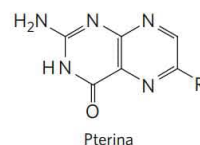
Os aminoácidos degradados em piruvato, α -cetoglutarato, succinil-CoA, fumarato e/ou oxalacetato podem ser convertidos em glicose e glicogênio pelas vias descritas nos Capítulos 14 e 15. Esses são aminoácidos **glicogênicos**. Aminoácidos glicogênicos e cetogênicos não são excludentes entre si; cinco aminoácidos – triptofano, fenilalanina, tirosina, treonina e isoleucina – são tanto cetogênicos quanto glicogênicos. O catabolismo dos aminoácidos é especialmente crítico para a sobrevivência de animais em dietas ricas em proteína ou durante o jejum. A leucina é um aminoácido exclusivamente cetogênico, muito comum em

proteínas. Sua degradação contribui substancialmente para a cetose em condições de jejum prolongado.

Diversos cofatores enzimáticos desempenham papéis importantes no catabolismo dos aminoácidos

Uma variedade de rearranjos químicos interessantes ocorre nas vias catabólicas dos aminoácidos. Será útil começar o estudo dessas vias observando classes de reações recorrentes e apresentando seus cofatores enzimáticos. Já foi abordada uma importante classe: as reações de transaminação que necessitam de piridoxal-fosfato. Outro tipo comum de reação no catabolismo de aminoácidos é a transferência de grupos de um carbono. Essas transferências geralmente envolvem um destes três cofatores: biotina, tetra-hidrofolato ou *S*-adenosilmetionina (Figura 18-16). Esses cofatores transferem grupos de um carbono em diferentes estados de oxidação: a biotina transfere grupos de um carbono em seu estado mais oxidado, CO_2 (ver Figura 14-19); o tetra-hidrofolato transfere grupos de um carbono em estados intermediários de oxidação e, algumas vezes, como grupos metila; e a *S*-adenosilmetionina transfere grupos metila, o estado mais reduzido do carbono. Os últimos dois cofatores são especialmente importantes para o metabolismo dos aminoácidos e dos nucleotídeos.

A molécula do **tetra-hidrofolato (H_4 -folato)**, sintetizada em bactérias, consiste em três porções: pterina substituída (6-metilpterina), *p*-aminobenzoato e glutamato (Figura 18-16).



A forma oxidada, o folato, é uma vitamina para os mamíferos, sendo convertida, por meio de duas etapas, em tetra-hidrofolato pela ação da enzima di-hidrofolato-redutase. O grupo de um carbono a ser transferido, em qualquer dos três estados possíveis de oxidação, está ligado ao N-5, ou ao N-10 ou a ambos. A forma mais reduzida do cofator carrega um grupo metila, uma forma mais oxidada carrega um

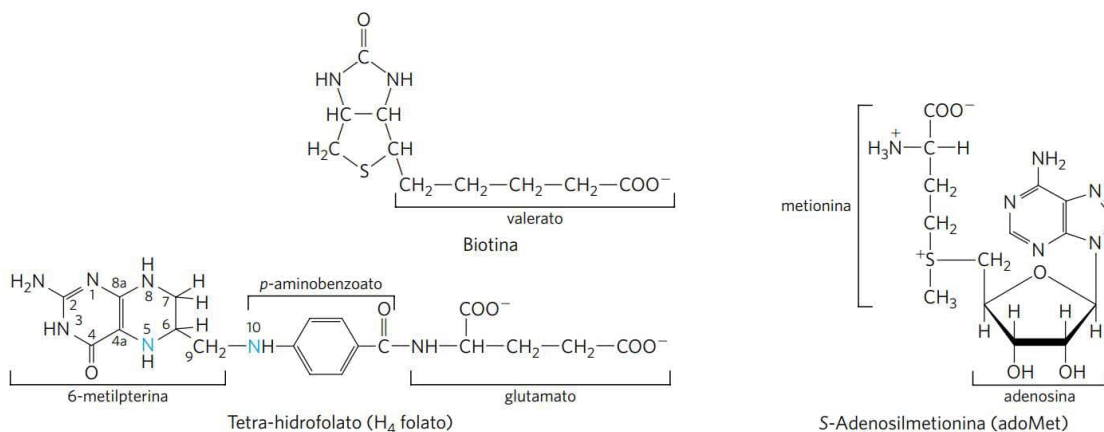


FIGURA 18-16 Alguns cofatores enzimáticos importantes em reações de transferência de um carbono. Os átomos de nitrogênio aos quais os grupos de um carbono estão ligados ao tetra-hidrofolato estão mostrados em azul.

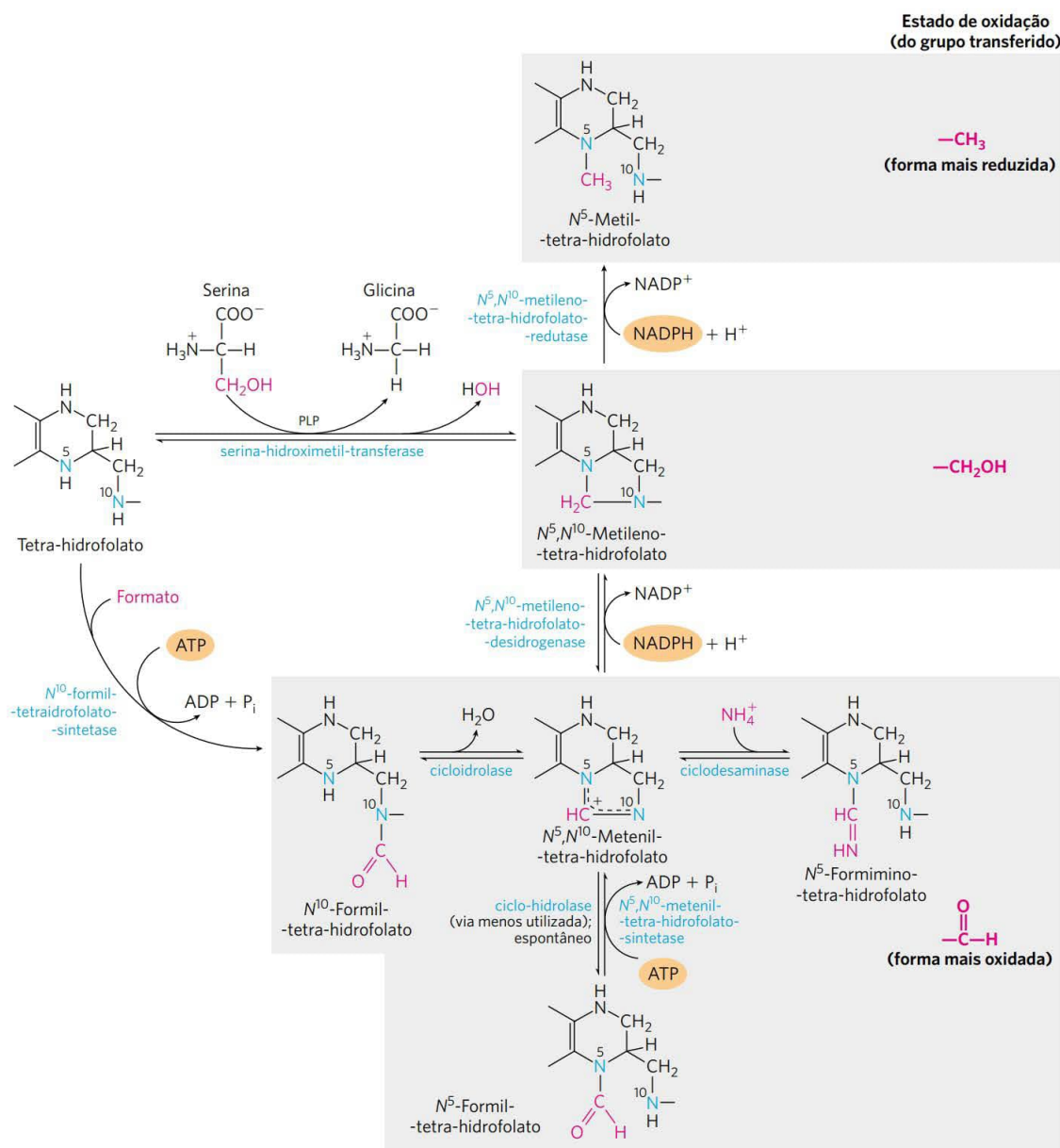


FIGURA 18-17 Conversões de unidades de um carbono ligadas ao tetra-hidrofolato. As diferentes espécies moleculares estão agrupadas de acordo com seu estado de oxidação, com as mais reduzidas na parte superior e as mais oxidadas na parte inferior da figura. Todas as espécies dentro de um único quadro sombreado estão no mesmo estado de oxidação. A conversão de $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -metileno-tetra-hidrofolato em N^5 -metiltetra-hidrofolato é efetivamente irreversível. A transferência enzimática de grupos formila, como na síntese das purinas (ver Figura 22-35) e na formação de formilmetionina nas bactérias (Capítulo 27), geralmente utiliza N^{10} -formiltetra-hidrofolato, em vez de N^5 -formiltetra-hidrofolato. Este último é significativamente mais estável e, portanto, um doador menos eficiente de grupos formila. O N^5 -formiltetra-hidrofolato é um produto colateral na reação da ciclo-hidrolase e também pode se formar espontaneamente. A conversão de N^5 -formiltetra-hidrofolato em $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -metileno-tetra-hidrofolato requer ATP, pois de outra forma o equilíbrio dessa reação seria desfavorável. Observe que o N^5 -formiminotetra-hidrofolato é derivado da histidina, em uma via mostrada na Figura 18-26.

grupo metileno e as formas ainda mais oxidadas carregam um grupo metenila, formila ou formimino (**Figura 18-17**). As formas de tetra-hidrofolato são, em sua maioria, interconversíveis, funcionando como doadores de unidades de um carbono em uma grande variedade de reações metabólicas. A fonte principal de unidades de um carbono para o tetra-hidrofolato é o carbono removido da serina em sua conversão em glicina, produzindo $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -metileno-tetra-hidrofolato.

Embora o tetra-hidrofolato possa carregar um grupo metila em seu N-5, o potencial de transferência desse grupo metila é insuficiente para a maioria das reações biossintéticas. A **S-adenosilmetionina (adoMet)** é o cofator preferido para transferências biológicas do grupo metila. Esse cofator é sintetizado a partir do ATP e da metionina na reação catalisada pela **metionina-adenosil-transferase** (**Figura 18-18**, etapa 1). Essa reação é incomum, pelo fato de o átomo de enxofre nucleofílico da metionina atacar o carbono 5' da ri-

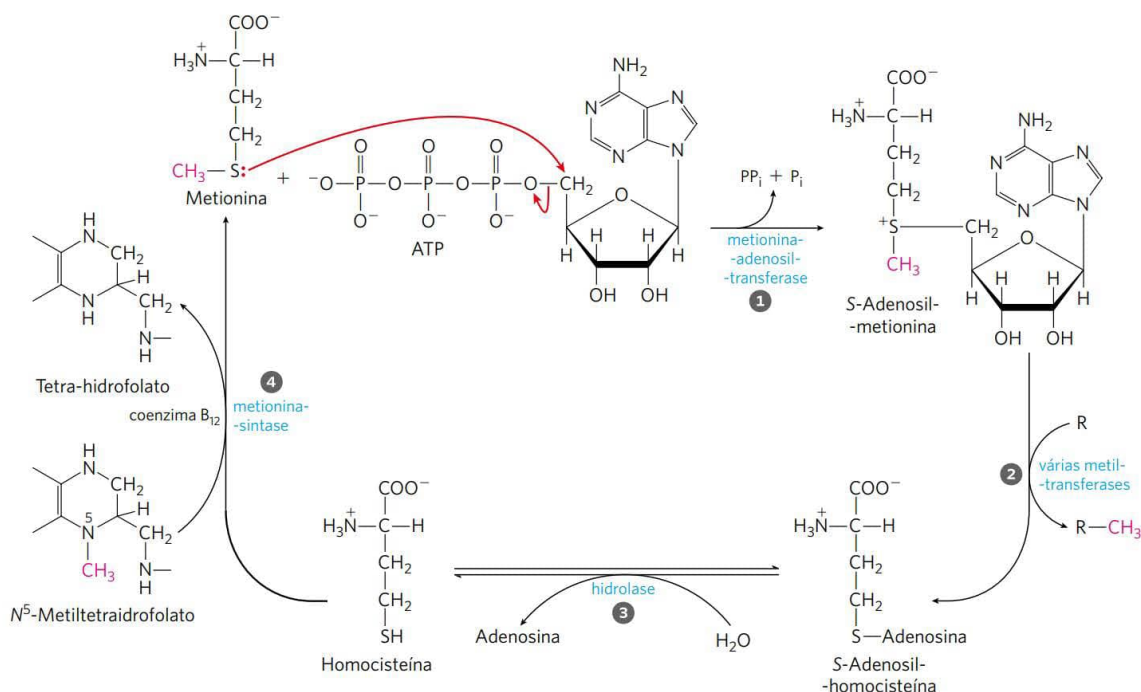


FIGURA 18-18 Síntese de metionina e de S-adenosilmetionina em um ciclo de ativação de grupo metila. As etapas estão descritas no texto. Na reação da metionina-sintase (etapa 1), o grupo metila é transferido para a cobalamina, formando metilcobalamina, que, por sua vez, é doadora da metila na formação da metionina. A S-adenosilmetionina, que apresenta um enxofre carregado positivamente (sendo, portanto, um íon sulfônio), é um poderoso agente metilante em diversas reações biossintéticas. O aceptor do grupo metila (etapa 2) é designado R.

bose do ATP, em vez de atacar um dos átomos de fósforo. O trifosfato é liberado e clivado em P_i e PP_i pela enzima, e o PP_i é hidrolisado pela pirofosfatase inorgânica. Desse modo, três ligações são quebradas nessa reação, incluindo duas ligações de alta energia de grupos fosfato. A única outra reação conhecida na qual o trifosfato é deslocado do ATP ocorre na síntese da coenzima B₁₂ (ver Quadro 17-2, Figura 3).

A S-adenosilmetionina é um potente agente alquilante, em virtude de seu íon sulfônio desestabilizado. O grupo metila está sujeito ao ataque de nucleófilos, sendo cerca de mil vezes mais reativo que o grupo metila do N⁵-metiltetra-hidrofolato.

A transferência do grupo metila da S-adenosilmetionina para um aceptor produz **S-adenosilhomocisteína** (Figura 18-18, etapa 2), posteriormente degradada em homocisteína e adenosina (etapa 3). A metionina é regenerada pela transferência de um grupo metila para a homocisteína, em reação catalisada pela metionina-sintase (etapa 4), e a metionina é novamente convertida em S-adenosilmetionina para completar um ciclo de ativação da metila.

Uma forma de metionina-sintase comum em bactérias utiliza N⁵-metiltetra-hidrofolato como doador da metila. Outra forma dessa enzima, presente em algumas bactérias e nos mamíferos, utiliza N⁵-metiltetra-hidrofolato, porém o grupo metila é inicialmente transferido para a cobalamina, derivada da vitamina B₁₂, formando metilcobalamina, usada como doadora da metila para a formação da metionina. Essa reação e o rearranjo da L-metilmalonil-CoA para produzir succinil-CoA (ver Quadro 17-2, Figura Q-1a) são as duas únicas reações conhecidas que são dependentes da coenzima B₁₂ nos mamíferos.



As vitaminas B₁₂ e folato estão fortemente relacionadas nessas vias metabólicas. A doença causada por deficiência de vitamina B₁₂, a **anemia perniciosa**, é rara, sendo observada apenas em pessoas com defeitos nas vias para absorção intestinal dessa vitamina (ver Quadro 17-2) ou em vegetarianos estritos (a vitamina B₁₂ não está presente em plantas). A doença progride vagarosamente, pois apenas quantidades pequenas de vitamina B₁₂ são necessárias e os depósitos normais dessa vitamina no fígado podem durar de 3 a 5 anos. Os sintomas incluem, além da anemia, vários distúrbios neurológicos.

A anemia pode ser seguida até a reação da metionina-sintase. Como mencionado, o grupo metila da metilcobalamina origina-se do N⁵-metiltetra-hidrofolato e essa é a única reação que utiliza N⁵-metiltetra-hidrofolato nos mamíferos. A reação que converte a forma N⁵, N¹⁰-metileno na forma N⁵-metila do tetra-hidrofolato é irreversível (Figura 18-17). Assim, se a coenzima B₁₂ não estiver disponível para a síntese de metilcobalamina, o folato metabólico é mantido na forma N⁵-metila. A anemia associada com a deficiência de vitamina B₁₂ é denominada **anemia megaloblástica**. Suas manifestações incluem uma redução na produção de eritrócitos (as células vermelhas do sangue) maduros e o aparecimento, na medula óssea, de células precursoras imaturas, os **megaloblastos**. Os eritrócitos normais são gradualmente substituídos no sangue por um número menor de eritrócitos anormalmente grandes, denominados **macrócitos**. O defeito no desenvolvimento eritrocitário é consequência direta da depleção de N⁵, N¹⁰-metilenotetra-hidrofolato, necessário para a síntese de nucleotídeos da timidina utilizados na síntese de DNA (ver Capítulo 22). A deficiência

de folato, na qual todas as formas de tetra-hidrofolato estão depletadas, também leva à anemia, basicamente pelas mesmas razões. Os sintomas da anemia pela deficiência de vitamina B₁₂ podem ser atenuados pela administração tanto de vitamina B₁₂ quanto de folato.

Todavia, é perigoso tratar a anemia perniciosa com a suplementação de folato apenas, pois os sintomas neurológicos da deficiência de vitamina B₁₂ progredirão. Esses sintomas não surgem da deficiência na reação da metionina-sintase. O prejuízo na atividade da metilmalonil-CoA-mutase (ver Quadro 17-2 e Figura 17-12) causa acúmulo de ácidos graxos incomuns, com número ímpar de carbonos, nas membranas neuronais. Portanto, a anemia associada à deficiência de folato é frequentemente tratada com a administração de ambos, folato e vitamina B₁₂, ao menos até que a origem metabólica da anemia esteja claramente definida. O diagnóstico precoce de deficiência de vitamina B₁₂ é importante, pois algumas condições neurológicas a ela associadas podem ser irreversíveis.

A deficiência de folato também diminui a disponibilidade de N⁵-metiltetra-hidrofolato, necessário para a função da metionina-sintase. Isso leva a um aumento nos níveis de homocisteína no sangue, condição relacionada com doença cardíaca, hipertensão e acidente vascular cerebral. Níveis elevados de homocisteína podem ser responsáveis por 10%

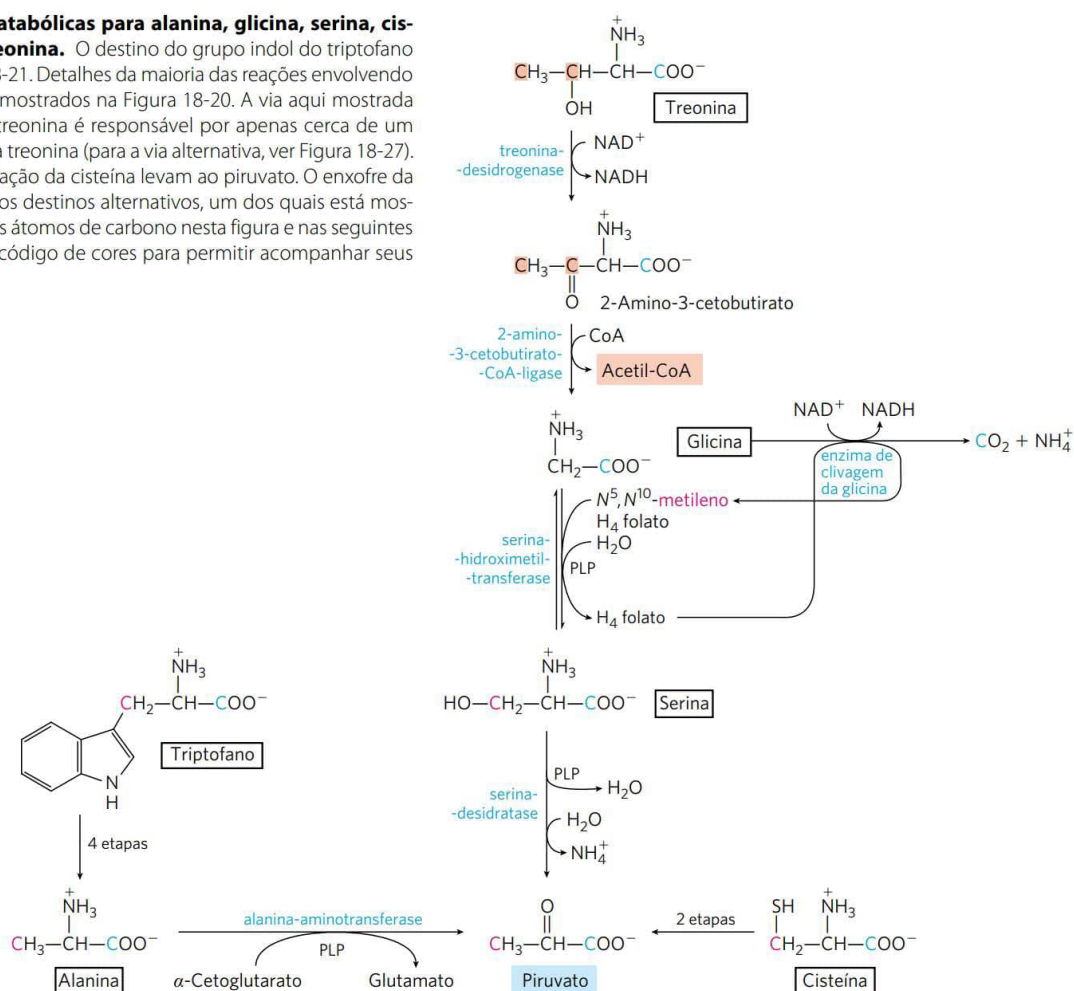
de todos os casos de doença cardíaca. Essa condição é tratada com suplementação com folato. ■

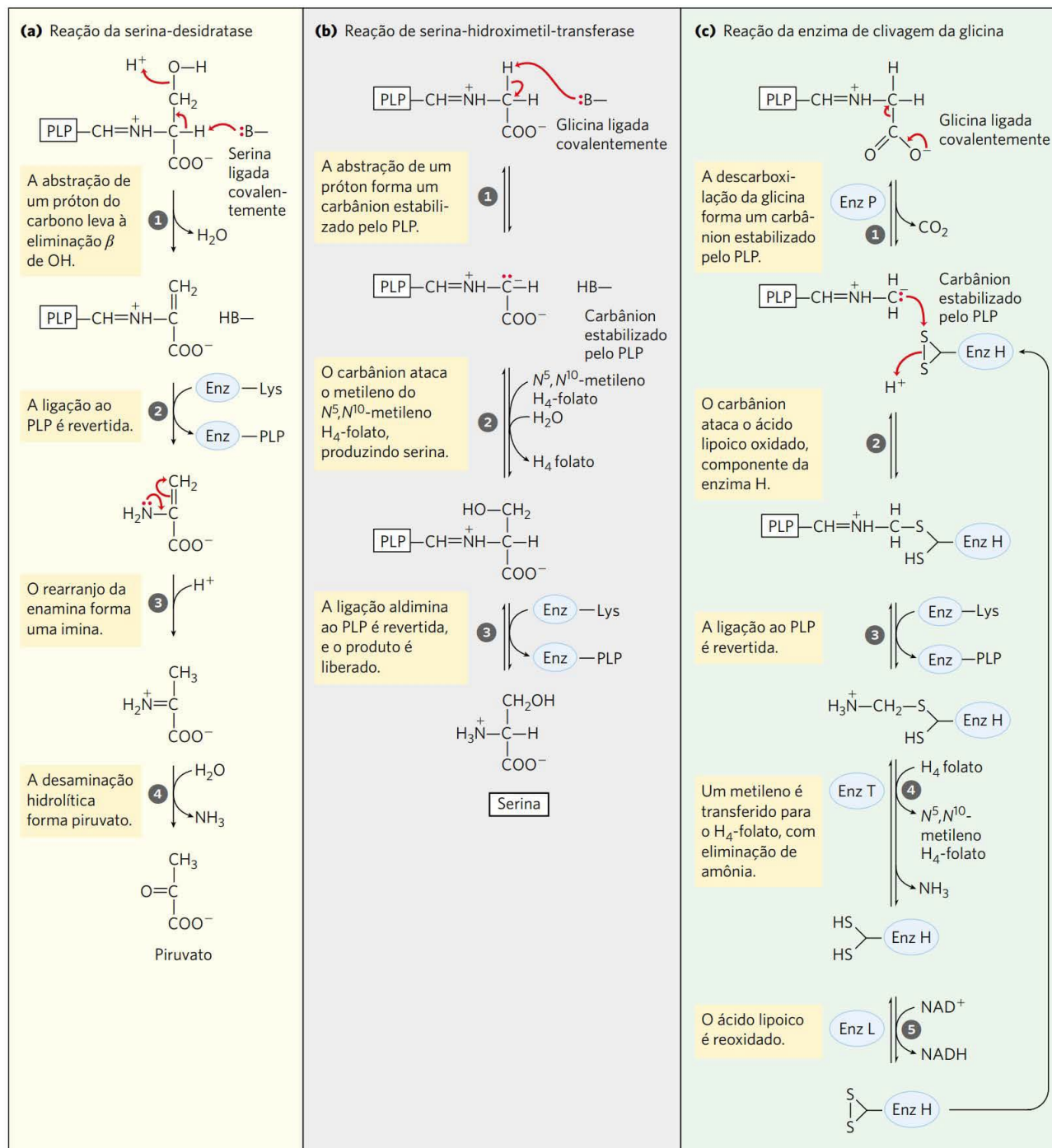
A **tetra-hidrobiopterina**, outro cofator utilizado no catabolismo dos aminoácidos, é semelhante à porção pterina do tetra-hidrofolato, mas não está envolvida em reações de transferência de grupos de um carbono e, sim, em reações de oxidação. Seu modo de ação será abordado quando for discutida a degradação da fenilalanina (ver Figura 18-24).

Seis aminoácidos são degradados até piruvato

Os esqueletos carbonados de seis aminoácidos são convertidos, total ou parcialmente, em piruvato. O piruvato pode, então, ser convertido em acetil-CoA e, por fim, oxidado via ciclo do ácido cítrico ou ser convertido em oxalacetato e encaminhado para a gliconeogênese. Os seis aminoácidos são a alanina, o triptofano, a cisteína, a serina, a glicina e a treonina (Figura 18-19). A **alanina** produz piruvato diretamente, por transaminação com o α -cetoglutarato, e a cadeia lateral do **triptofano** é clivada, produzindo alanina e, portanto, piruvato. A **cisteína** é convertida em piruvato por meio de duas etapas; inicialmente, é removido o átomo de enxofre e, a seguir, ocorre uma transaminação. A **serina** é convertida em piruvato pela serina-desidratase. Tanto o grupo hidroxila do carbono β quanto o grupo α -amino da serina são removidos nesta única reação dependente de piridoxal-fosfato (Figura 18-20a).

FIGURA 18-19 Vias catabólicas para alanina, glicina, serina, cisteína, triptofano e treonina. O destino do grupo indol do triptofano é mostrado na Figura 18-21. Detalhes da maioria das reações envolvendo a serina e a glicina são mostrados na Figura 18-20. A via aqui mostrada para a degradação da treonina é responsável por apenas cerca de um terço do catabolismo da treonina (para a via alternativa, ver Figura 18-27). Diversas vias de degradação da cisteína levam ao piruvato. O enxofre da cisteína pode ter diversos destinos alternativos, um dos quais está mostrado na Figura 22-17. Os átomos de carbono nesta figura e nas seguintes são mostrados em um código de cores para permitir acompanhar seus destinos.





MECANISMO-FIGURA 18-20 Interações entre os cofatores piridoxal-fosfato e tetra-hidrofolato no metabolismo da serina e da glicina.

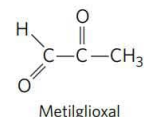
A primeira etapa em cada uma dessas reações (não mostrada) envolve a formação de uma ligação covalente imina entre o PLP ligado à enzima e o aminoácido substrato da reação – serina em (a), glicina em (b) e (c). **(a)** Uma eliminação de água catalisada pelo PLP na reação da serina-desidratase (etapa 1) inicia a via para o piruvato. **(b)** Na reação da serina-hidroximetil-transferase, um carbânion estabilizado pelo PLP (produto da etapa 1) é um intermediário-chave na transferência reversível do grupo metileno (como $-\text{CH}_2-\text{OH}$) do N^5, N^{10} -metilenotetra-hidrofolato, para formar serina. **(c)** A enzima de clivagem da glicina é um complexo multienzimático, contendo os componentes P, H, T e L. A reação geral, que é reversível, converte glicina em CO_2 e NH_4^+ , sendo o segundo carbono da glicina captado pelo tetra-hidrofolato para formar N^5, N^{10} -metilenotetra-hidrofolato. O piridoxal-fosfato ativa o carbono α do aminoácido em estágios críticos em todas essas reações, e o tetra-hidrofolato carrega unidades de um carbono em duas delas (ver Figuras 18-6 e 18-17).

A **glicina** pode ser degradada por meio de três vias, apenas uma delas produzindo piruvato. A glicina é convertida em serina pela adição enzimática de um grupo hidroximetila (Figuras 18-19 e 18-20b). Essa reação, catalisada pela **serina-hidroximetil-transferase**, requer as coenzimas tetra-hidrofolato e piridoxal-fosfato. A serina é convertida em piruvato, como descrito anteriormente. Na segunda via, que predomina nos animais, a glicina sofre clivagem oxidativa, produzindo CO_2 , NH_4^+ e um grupo metileno ($-\text{CH}_2-$) (Figuras 18-19 e 18-20c). Essa reação facilmente reversível, catalisada pela **enzima de clivagem da glicina** (também denominada glicina-sintase), também requer tetra-hidrofolato, que recebe o grupo metileno. Nessa via de clivagem oxidativa, os dois átomos de carbono da glicina não entram no ciclo do ácido cítrico. Um carbono é perdido como CO_2 e o outro se torna o grupo metileno do N^5, N^{10} -metilenotetra-hidrofolato (Figura 18-17), doador de grupos de um carbono em certas vias biossintéticas.



Essa segunda via de degradação da glicina parece ser essencial para os mamíferos. Os seres humanos com defeitos graves envolvendo a atividade da enzima de clivagem da glicina sofrem de uma condição conhecida como hiperglicinemia não cetótica. Essa condição se caracteriza por níveis séricos elevados de glicina, levando a gra-

ves deficiências mentais e morte no início da infância. Em níveis elevados, a glicina é um neurotransmissor inibitório, o que pode explicar os efeitos neurológicos da doença. Talvez mais importante, os níveis elevados de glicina aumentam os níveis de 2-amino-3-cetobutirato, um intermediário instável na degradação da treonina na mitocôndria (Figura 18-19). O 2-amino-3-cetobutirato sofre descarboxilação espontânea, formando o metabólito tóxico aminoacetona, que é facilmente metabolizado a uma molécula altamente reativa, o **metilglioxal**, capaz de modificar tanto proteínas quanto DNA.



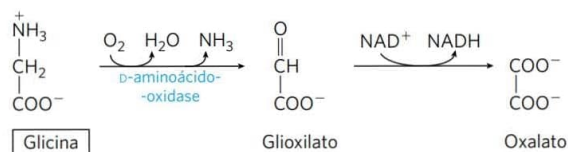
O metilglioxal é também um produto colateral secundário da glicólise e está implicado na progressão do diabetes tipo 2 (Quadro 7-1).

Muitos defeitos genéticos do metabolismo dos aminoácidos foram identificados em seres humanos (Tabela 18-2) e, ao longo deste capítulo, encontraremos vários outros. ■

TABELA 18-2 Algumas doenças genéticas humanas que afetam o catabolismo dos aminoácidos

Condição médica	Incidência aproximada (por 100.000 nascimentos)	Processo defeituoso	Enzima defeituosa	Sintomas e efeitos
Albinismo	< 3	Síntese de melanina a partir de tirosina	Tirosina-3-monoxigenase (tirosinase)	Falta de pigmentação; cabelo branco, pele rosada
Alcaptonúria	< 0,4	Degradação da tirosina	Homogentisato-1,2-dioxi-genase	Pigmento escuro na urina; artrite se desenvolve posteriormente
Argininemia	< 0,5	Síntese de ureia	Arginase	Deficiência intelectual
Acidemia argininossuccínica	< 1,5	Síntese de ureia	Arginino-succinase	Vômitos; convulsões
Deficiência de carbamoil-fosfato-sintetase I	< 0,5	Síntese de ureia	Carbamoil-fosfato-sintetase I	Letargia; convulsões; morte prematura
Homocistinúria	< 0,5	Degradação da metionina	Cistationina β -sintase	Desenvolvimento inadequado dos ossos; deficiência intelectual
Doença do xarope de bordo (cetoacidúria de cadeia ramificada)	< 0,4	Degradação de isoleucina, leucina e valina	Complexo da desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada	Vômitos; convulsões; deficiência intelectual; morte prematura
Acidemia metilmalonônica	< 0,5	Conversão de propionil-CoA em succinil-CoA	Metilmalonil-CoA-mutase	Vômitos; convulsões; deficiência intelectual; morte prematura
Fenilcetonúria	< 8	Conversão de fenilalanina em tirosina	Fenilalanina-hidroxilase	Vômitos no período neonatal; deficiência intelectual

Na terceira e última via de degradação da glicina, a molécula não quiral da glicina é substrato para a enzima D-aminoácido-oxidase. A glicina é convertida em glioxilato, um substrato alternativo para a lactato-desidrogenase (p. 553). O glioxilato é oxidado, produzindo oxalato, em reação dependente de NAD^+ :



Acredita-se que a principal função da D-aminoácido-oxidase, presente em níveis elevados nos rins, seja a destoxificação de D-aminoácidos absorvidos, derivados das paredes celulares bacterianas e de alimentos grelhados (temperaturas elevadas causam certo grau de racemização espontânea de L-aminoácidos presentes nas proteínas). O oxalato, seja obtido a partir da dieta ou produzido enzimaticamente nos rins, tem importância médica. Cristais de oxalato de cálcio representam até 75% de todos os cálculos renais. ■

Há duas vias significativas para a degradação da **treonina**. Uma via leva à produção de piruvato via glicina (Figura 18-19). A conversão em glicina ocorre em duas etapas, com a treonina sendo convertida em 2-amino-3-cetobutirato pela ação da treonina-desidrogenase. Essa via é importante para umas poucas classes de células humanas de divisão rápida, como as células-tronco embrionárias. A glicina gerada nessa via é degradada pela enzima de clivagem da glicina (Figura 18-19). O $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -metilenotetra-hidrofolato gerado nessa reação (Figura 18-20c) é necessário para a síntese, por meio de vias metabólicas descritas no Capítulo 22, de nucleotídeos utilizados na replicação do DNA. Na maior parte dos tecidos humanos, contudo, a degradação da treonina via glicina é uma via relativamente menos importante, sendo responsável por 10 a 30% do catabolismo da treonina. Ela é mais importante em alguns outros mamíferos. A principal via, na maioria dos tecidos humanos, leva à succinil-CoA, como será descrito posteriormente neste capítulo.

Em laboratório, a serina-hidroximetil-transferase catalisa a conversão de treonina em glicina e acetaldeído em uma etapa, porém essa rota não é importante para a degradação da treonina em mamíferos.

Sete aminoácidos são degradados, produzindo acetil-CoA

Partes dos esqueletos carbonados de sete aminoácidos – **triptofano, lisina, fenilalanina, tirosina, leucina, isoleucina e treonina** – produzem acetil-CoA e/ou acetoacetil-CoA, esta última sendo convertida em acetil-CoA (Figura 18-21). Algumas das etapas finais das vias de degradação da leucina, da lisina e do triptofano assemelham-se a etapas da oxidação dos ácidos graxos (ver Figura 17-9). A treonina produz alguma acetil-CoA (não mostrado na Figura 18-21) por meio da rota secundária ilustrada na Figura 18-19.

As vias de degradação de dois desses sete aminoácidos merecem especial atenção. A degradação do triptofano é a mais complexa de todas as vias do catabolismo de aminoácidos em tecidos animais. Partes do triptofano (quatro de seus carbonos) produzem acetil-CoA, via acetoacetil-CoA. Alguns intermediários no catabolismo do triptofano são precursores para a síntese de outras biomoléculas (Figura 18-22), incluindo o nicotinato (um precursor do NAD^+ e do NADP^+ nos animais), a serotonina (um neurotransmissor em vertebrados) e o indolacetato (um fator de crescimento em plantas). Algumas dessas vias biossintéticas estão descritas mais detalhadamente no Capítulo 22 (ver Figuras 22-30 e 22-31).

A degradação da fenilalanina é notável, pois defeitos genéticos nas enzimas dessa via levam a diversas doenças humanas herdadas (Figura 18-23), conforme discutido a seguir. A fenilalanina e a tirosina, produto de sua oxidação (ambas com nove carbonos), são degradadas em dois fragmentos, ambos podendo entrar no ciclo do ácido cítrico: quatro dos nove átomos de carbono produzem acetoacetato livre, o qual é convertido em acetoacetil-CoA e, então, em acetil-CoA, e um segundo fragmento de quatro carbonos é recuperado como fumarato. Dessa forma, oito dos nove carbonos desses aminoácidos entram no ciclo do ácido cítrico; o carbono restante é perdido como CO_2 . A fenilalanina, após ser hidroxilada, produzindo tirosina, também é precursora da dopamina, um neurotransmissor, e da noradrenalina e da adrenalina, hormônios secretados pela medula da glândula suprarrenal (ver Figura 22-31).*

O catabolismo da fenilalanina é defeituoso geneticamente em algumas pessoas



Considerando que muitos aminoácidos são neurotransmissores, ou precursores de neurotransmissores, ou antagonistas deles, não é de surpreender que defeitos genéticos no metabolismo dos aminoácidos possam causar prejuízo no desenvolvimento neural e deficiência intelectual. Em muitas dessas doenças, intermediários específicos acumulam-se. Por exemplo, um defeito genético na **fenilalanina-hidroxilase**, a primeira enzima na via catabólica da fenilalanina (Figura 18-23), é responsável pela doença **fenilcetonúria** (PKU, do inglês, *phenylketonuria*), a causa mais comum de níveis elevados de fenilalanina no sangue (hiperfenilalaninemia).

A fenilalanina-hidroxilase (também denominada fenilalanina-4-monooxigenase) é uma enzima de uma classe geral de enzimas, denominadas **oxidases de função mista** (ver Quadro 21-1), que catalisam simultaneamente a hidroxilação de um substrato por um átomo de oxigênio do O_2 e a redução do outro átomo de oxigênio em H_2O . A fenilalanina-hidroxilase requer o cofator tetra-hidrobiopterina, que transfere elétrons do NADPH ao oxigênio, oxidando-se a di-hidrobiopterina no processo (Figura 18-24). Em seguida, esse cofator é reduzido pela enzima **di-hidrobiopterina-redutase**, em uma reação que requer NADPH.

*N. de T. Estas catecolaminas também atuam como neurotransmissores. A melanina, o pigmento escuro observado na pele e no cabelo, também é derivada da tirosina.

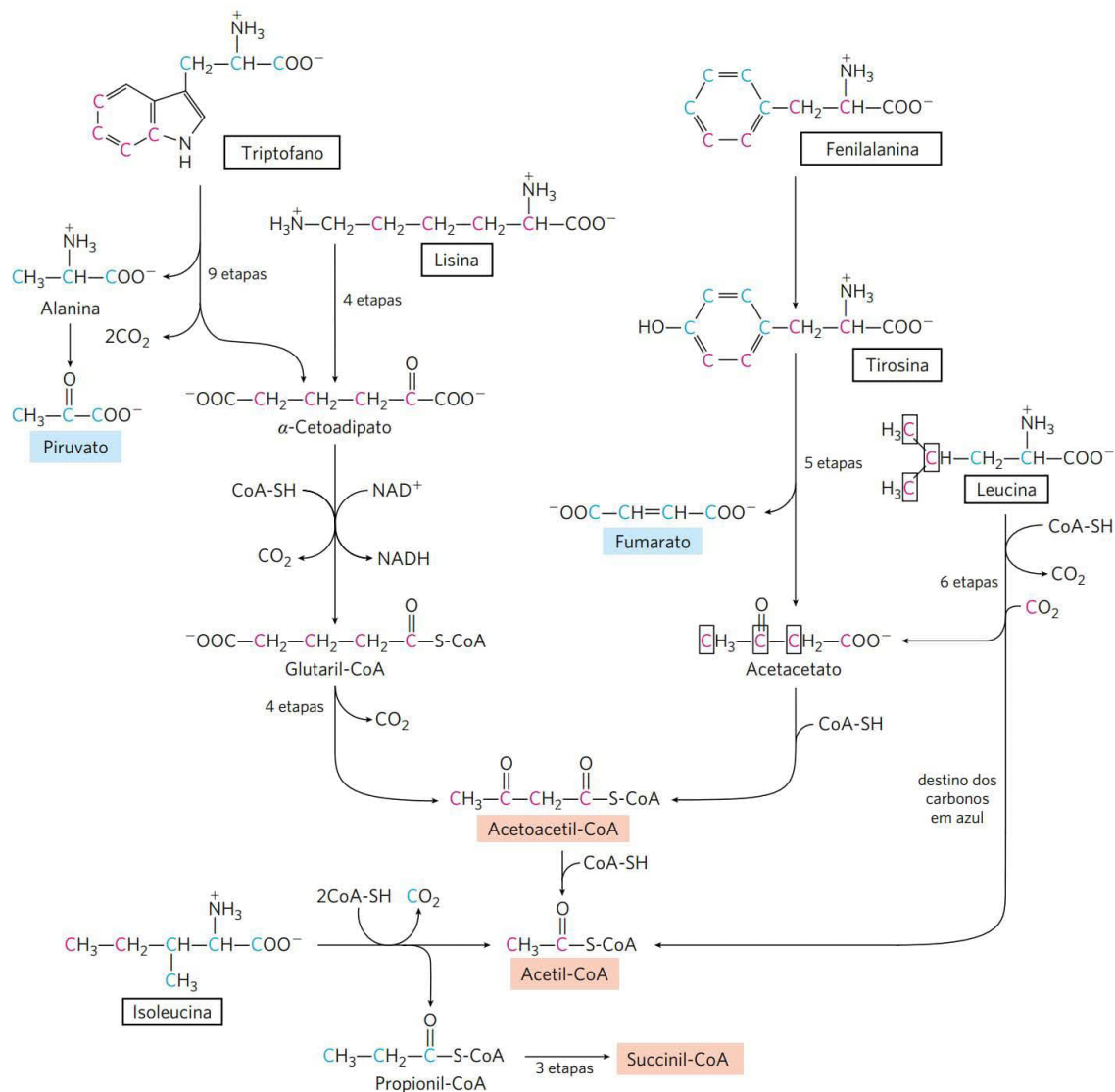


FIGURA 18-21 Vias catabólicas para triptofano, lisina, fenilalanina, tirosina, leucina e isoleucina. Esses aminoácidos doam alguns de seus carbonos (em cor salmão) para a acetil-CoA. O triptofano, a fenilalanina, a tirosina e a isoleucina também fornecem carbonos (em azul) para a produção de piruvato ou de intermediários do ciclo do ácido cítrico. A via da fenilalanina está descrita mais detalhadamente na Figura 18-23. O destino dos átomos de nitrogênio não é seguido neste esquema; na maior parte dos casos, eles são transferidos para o α-cetoglutarato para formar glutamato.

Em pessoas com PKU, uma rota secundária do metabolismo da fenilalanina, normalmente pouco utilizada, passa a desempenhar um papel mais proeminente. Nessa rota, a fenilalanina sofre transaminação com o piruvato, produzindo **fenilpiruvato (Figura 18-25)**. A fenilalanina e o fenilpiruvato acumulam-se no sangue e nos tecidos e são excretados na urina – daí o nome “fenilcetonúria”. Uma quantidade considerável de fenilpiruvato não é excretada como tal, mas sofre descarboxilação a fenilacetato ou redução a fenil-lactato. O fenilacetato confere à urina um odor característico, tradicionalmente utilizado por enfermeiros para detectar PKU em bebês. O acúmulo de fenilalanina ou de seus metabólitos no início da vida prejudica o desenvolvimento normal do cérebro, causando grave deficiência intelectual. Isso pode ser causado pelo excesso de fenilala-

nina, que compete com outros aminoácidos pelo transporte através da barreira hematoencefálica, resultando em déficit de metabólitos necessários.

A fenilcetonúria está entre os primeiros defeitos metabólicos herdados do metabolismo descobertos em seres humanos. Quando essa condição é detectada precocemente, a deficiência intelectual pode ser prevenida por um rígido controle dietético. A dieta deve fornecer fenilalanina em quantidade apenas suficiente para atender às necessidades para a síntese proteica. O consumo de alimentos ricos em proteínas deve ser reduzido. Proteínas naturais, como a caseína do leite, devem ser primeiramente hidrolisadas e boa parte da fenilalanina deve ser removida para que o paciente receba uma dieta adequada, pelo menos durante toda a sua infância. Uma vez que o adoçante artificial aspartame é um

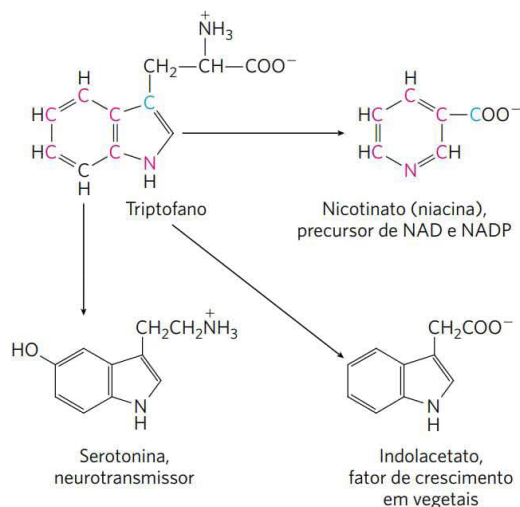


FIGURA 18-22 O triptofano como precursor. Os anéis aromáticos do triptofano originam o nicotinato (niacina), o indolacetato e a serotonina. Os átomos coloridos mostram a origem dos átomos do anel do nicotinato.

dipeptídeo contendo aspartato e um metil-éster da fenilalanina (ver Figura 1-25b), alimentos adoçados com aspartame contêm avisos dirigidos a pessoas recebendo dietas em que o conteúdo de fenilalanina deve ser controlado. Essas restrições dietéticas são difíceis de serem seguidas rigidamente durante a vida inteira, de modo que, muitas vezes, esse tratamento não elimina completamente os sintomas neurológicos. Um novo tratamento está sendo desenvolvido, no qual a enzima fenilalanina-amônia-liase é administrada oralmente ou injetada subcutaneamente, a fim de degradar a fenilalanina nas proteínas ingeridas em uma dieta menos rígida. A fenilalanina-amônia-liase é derivada de plantas, bactérias e de muitas leveduras e fungos, e normalmente contribui para a biossíntese de compostos polifenólicos, como os flavonoides. Ela degrada a fenilalanina, produzindo o metabólito não tóxico ácido *trans*-cinâmico e amônia; as pequenas quantidades de amônia geradas não chegam a ser tóxicas.

A fenilcetonúria também pode ser causada por um defeito na enzima que catalisa a regeneração da tetra-hidrobioterina (Figura 18-24). O tratamento, nesse caso, é mais complexo do que a restrição da ingestão de

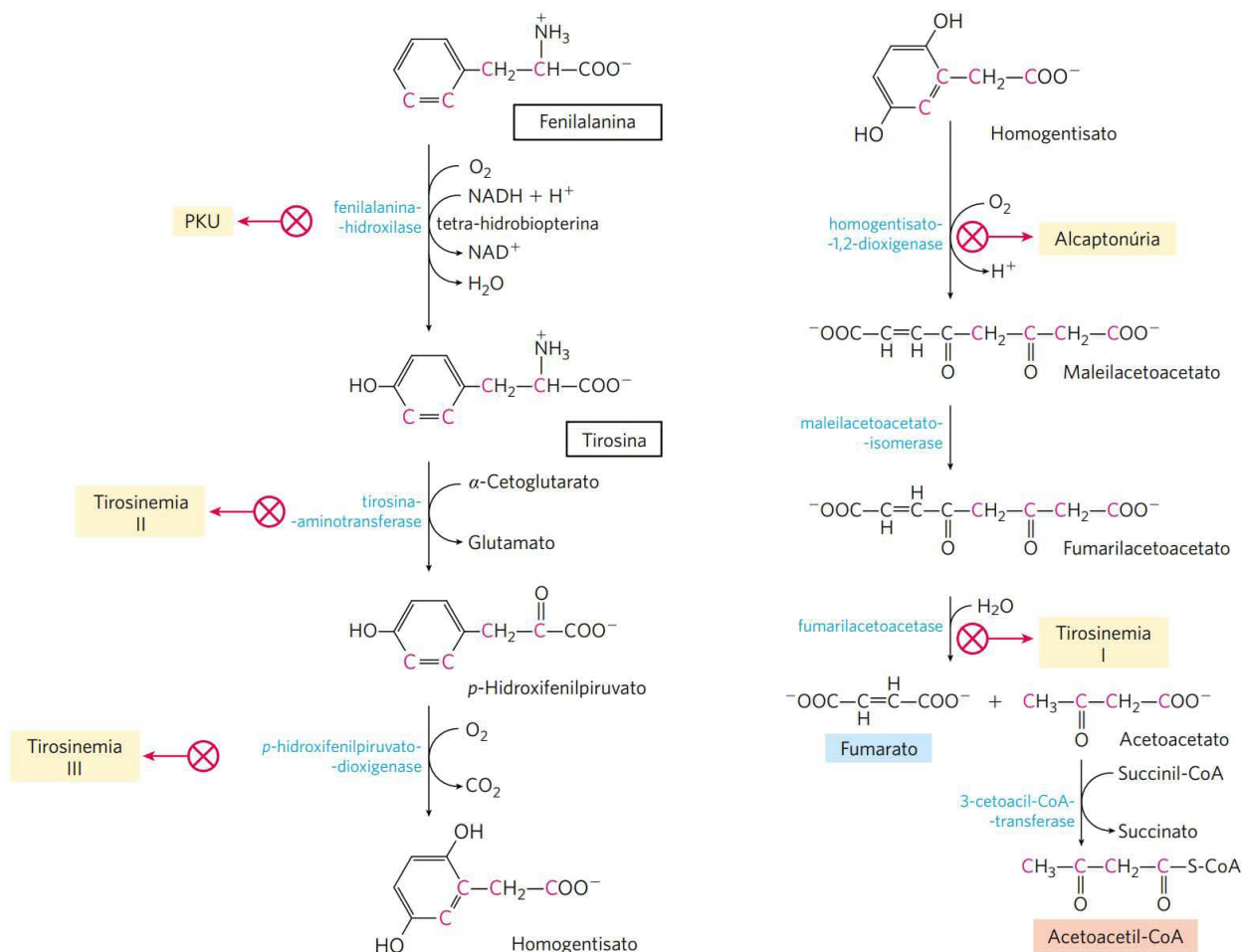


FIGURA 18-23 Vias catabólicas para a fenilalanina e a tirosina. Nos seres humanos, esses aminoácidos normalmente são convertidos em acetacetyl-CoA e fumarato. Defeitos genéticos em muitas dessas enzimas causam doenças humanas herdadas (sombreadas em amarelo).

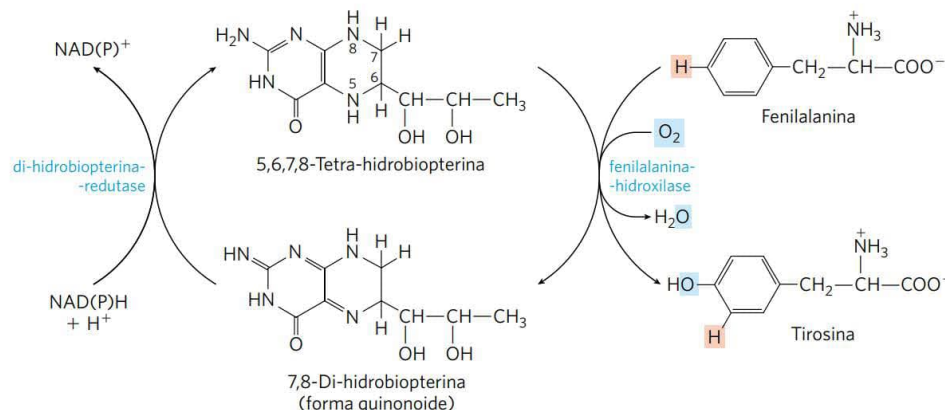


FIGURA 18-24 O papel da tetra-hidrobiopterina na reação da fenilalanina-hidroxilase. O átomo de H sombreado em cor-de-rosa é transferido diretamente do C-4 para o C-3 na reação. Essa característica, descoberta nos National Institutes of Health (NIH), é denominada “troca NIH”.

fenilalanina e tirosina. A tetra-hidrobiopterina também é necessária para a formação de L-3,4-di-hidroxifenilalanina (L-dopa), precursor dos neurotransmissores dopamina e noradrenalina, e de 5-hidroxitriptofano, precursor do neurotransmissor serotonina. Na fenilcetonúria desse tipo, esses precursores devem ser supridos na dieta, juntamente com tetra-hidrobiopterina.

A triagem de doenças genéticas em recém-nascidos pode apresentar uma relação custo-benefício bastante favorável, principalmente no caso da PKU. Os testes (que não mais se baseiam no odor da urina) são relativamente baratos e a detecção seguida pelo tratamento precoce da PKU

em bebês (oito a dez casos a cada 100.000 nascidos vivos) economiza, em posterior assistência à saúde, milhões de dólares por ano. Mais importante, evitar o trauma emocional pela detecção com esses testes simples é inestimável.*

Outra doença hereditária do catabolismo da fenilalanina é a **alcaptonúria**, na qual a enzima defeituosa é a **homogentisato-dioxigenase** (Figura 18-23). Menos grave que a PKU, essa condição produz poucos efeitos adversos, embora grandes quantidades de homogentisato sejam excretadas e sua oxidação torne a urina escura. Pessoas com alcaptonúria também são mais suscetíveis ao desenvolvimento de uma forma de artrite. A alcaptonúria é de considerável interesse histórico. Archibald Garrod descobriu, no início do século XX, que essa condição é herdada e investigou a causa até chegar à ausência de uma única enzima. Garrod foi o primeiro a estabelecer uma conexão entre um traço herdado e uma enzima – um grande avanço no caminho que, por fim, levaria à nossa atual compreensão dos genes e das vias de expressão da informação, descritas na Parte III. ■

Cinco aminoácidos são convertidos em α -cetoglutarato

Os esqueletos carbonados de cinco aminoácidos (prolina, glutamato, glutamina, arginina e histidina) entram no ciclo do ácido cítrico como α -cetoglutarato (**Figura 18-26**). A **prolina**, o **glutamato** e a **glutamina** têm esqueletos de cinco carbonos. A estrutura cíclica da prolina é aberta pela oxidação do carbono mais distante do grupo carboxila, criando uma base de Schiff, seguindo-se a hidrólise da base de Schiff para produzir um semialdeído linear, o γ -semialdeído do glutamato. Esse intermediário é posteriormente oxidado no mesmo carbono, produzindo glutamato. A glutamina é convertida em glutamato na reação da glutaminase ou em qualquer outra entre as diversas reações enzimáticas em que a glutamina doa seu nitrogênio amídico a um aceptor. A transaminação ou a desaminação do glutamato produz α -cetoglutarato.

A **arginina** e a **histidina** contêm cinco carbonos adjacentes e um sexto carbono ligado por meio de um átomo de nitrogênio. Assim, a conversão catabólica desses aminoáci-

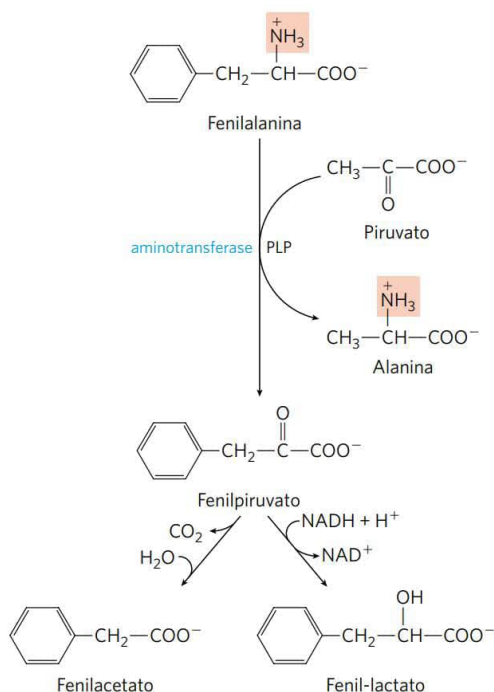


FIGURA 18-25 Rotas alternativas para o catabolismo da fenilalanina na fenilcetonúria. Na PKU, o fenilpiruvato acumula-se nos tecidos, no sangue e na urina. A urina pode ainda conter fenilacetato e fenil-lactato.

*N. de T. No Brasil, esse teste de triagem para erros inatos do metabolismo é conhecido como “teste do pezinho”.

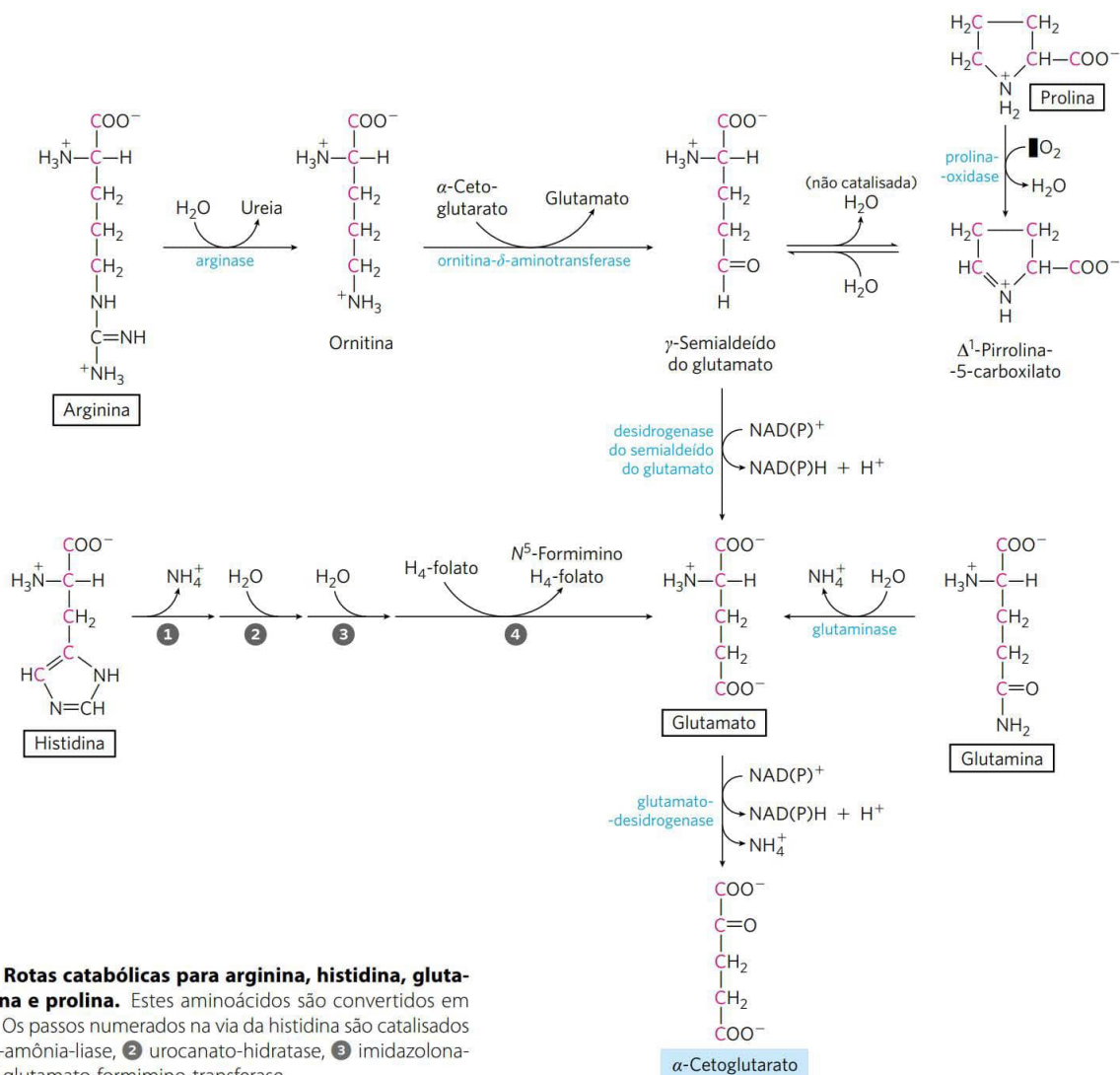


FIGURA 18-26 Rotas catabólicas para arginina, histidina, glutamato, glutamina e prolina. Estes aminoácidos são convertidos em α-cetoglutarato. Os passos numerados na via da histidina são catalisados por 1) histidina-amônia-liase, 2) urocanato-hidratase, 3) imidazolona-propionase e 4) glutamato-formimino-transferase.

dos em glutamato é um pouco mais complexa que a rota da prolina ou da glutamina (Figura 18-26). A arginina é convertida no esqueleto de cinco carbonos da ornitina, no ciclo da ureia (Figura 18-10), e a ornitina sofre transaminação, produzindo o γ-semialdeído do glutamato. A conversão da histidina em glutamato de cinco carbonos ocorre em uma rota de múltiplas etapas; o carbono extra é removido em uma etapa que utiliza tetra-hidrofolato como cofator.

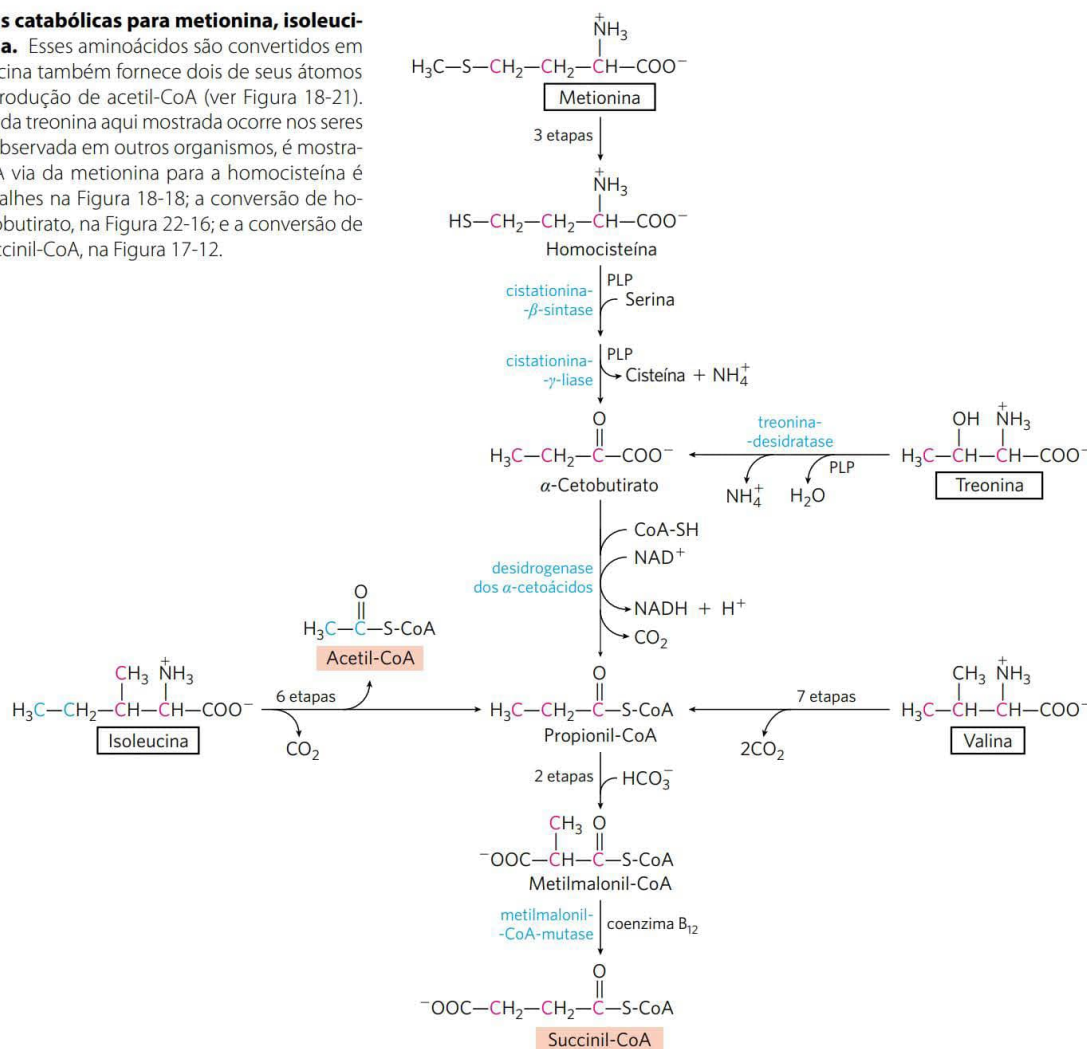
Quatro aminoácidos são convertidos em succinil-CoA

Os esqueletos carbonados da metionina, da isoleucina, da treonina e da valina são degradados por rotas que produzem succinil-CoA (Figura 18-27), um intermediário do ciclo do ácido cítrico. A **metionina** doa seu grupo metila a um de diversos aceptores possíveis, via *S*-adenosilmetionina, e três de seus quatro átomos de carbono remanescentes são convertidos no propionato da propionil-CoA, um precursor da succinil-CoA. A **isoleucina** sofre transaminação, seguindo-se a descarboxilação oxidativa do α-cetoácido resultante. O esqueleto restante, de cinco carbonos, é ainda mais oxidado, produzindo acetil-CoA e propionil-CoA. A **valina** so-

fre transaminação e descarboxilação, seguindo-se uma série de reações de oxidação que convertem os quatro carbonos restantes em propionil-CoA. Algumas partes das rotas de degradação da valina e da isoleucina apresentam um paralelo muito próximo a etapas da degradação de ácidos graxos (ver Figura 17-9). Em tecidos humanos, a **treonina** também é convertida, por meio de duas etapas, em propionil-CoA. Essa é a principal rota de degradação da treonina em seres humanos (ver na Figura 18-19 a via alternativa). O mecanismo para a primeira etapa é análogo àquele da reação catalisada pela serina-desidratase, sendo possível que as desidratases da serina e da treonina sejam, de fato, a mesma enzima.

A propionil-CoA derivada desses três aminoácidos é convertida em succinil-CoA por meio de uma via descrita no Capítulo 17: carboxilação, produzindo metilmalonil-CoA, epimerização da metilmalonil-CoA e conversão em succinil-CoA pela metilmalonil-CoA-mutase, dependente da coenzima B₁₂ (ver Figura 17-12). Na rara doença genética conhecida como acidemia metilmalônica, a metilmalonil-CoA-mutase é deficiente, com graves consequências metabólicas (Tabela 18-2; Quadro 18-2).

FIGURA 18-27 Rotas catabólicas para metionina, isoleucina, treonina e valina. Esses aminoácidos são convertidos em succinil-CoA; a isoleucina também fornece dois de seus átomos de carbono para a produção de acetil-CoA (ver Figura 18-21). A rota da degradação da treonina aqui mostrada ocorre nos seres humanos; outra via, observada em outros organismos, é mostrada na Figura 18-19. A via da metionina para a homocisteína é descrita em mais detalhes na Figura 18-18; a conversão de homocisteína em α -cetobutirato, na Figura 22-16; e a conversão de propionil-CoA em succinil-CoA, na Figura 17-12.



Os aminoácidos de cadeia ramificada não são degradados no fígado

Embora boa parte do catabolismo dos aminoácidos aconteça no fígado, os três aminoácidos com cadeias laterais ramificadas (leucina, isoleucina e valina) são oxidados como combustível principalmente pelos tecidos muscular, adiposo, renal e nervoso. Esses tecidos extra-hepáticos contêm uma aminotransferase, ausente no fígado, que atua sobre os três aminoácidos de cadeia ramificada, produzindo os α -cetoácidos correspondentes (**Figura 18-28**). O **complexo da desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada** catalisa, então, a descarboxilação oxidativa dos três α -cetoácidos, liberando o grupo carboxila como CO_2 e produzindo o derivado acil-CoA respectivo. Quanto à forma, essa descarboxilação é análoga a duas outras descarboxilações oxidativas que são encontradas no Capítulo 16: a oxidação do piruvato em acetil-CoA pelo complexo da piruvato-desidrogenase (ver Figura 16-6) e a oxidação do α -cetoglutarato em succinil-CoA pelo complexo da

α -cetoglutarato-desidrogenase (p. 630). De fato, esses três complexos enzimáticos são estruturalmente semelhantes e compartilham essencialmente o mesmo mecanismo de reação. Cinco cofatores (a tiamina-pirofosfato, o FAD, o NAD, o lipoato e a coenzima A) participam, e as três proteínas em cada complexo catalisam reações homólogas. Esse caso representa claramente uma situação em que a maquinaria enzimática que evoluiu para catalisar uma reação foi “emprestada” por duplicação gênica, evoluindo adicionalmente para catalisar reações semelhantes em outras vias.

Experimentos com ratos têm mostrado que o complexo da desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada é regulado por modificação covalente em resposta ao conteúdo de aminoácidos de cadeia ramificada na dieta. Quando houver pouco ou nenhum excedente de aminoácidos de cadeia ramificada ingeridos na dieta, o complexo enzimático é fosforilado por uma proteína cinase e, assim, inativado. A adição à dieta de excesso de aminoácidos de cadeia ramificada resulta na desfosforilação e consequente ativação da enzima. Lembre-se de que o complexo da piruvato-desidro-

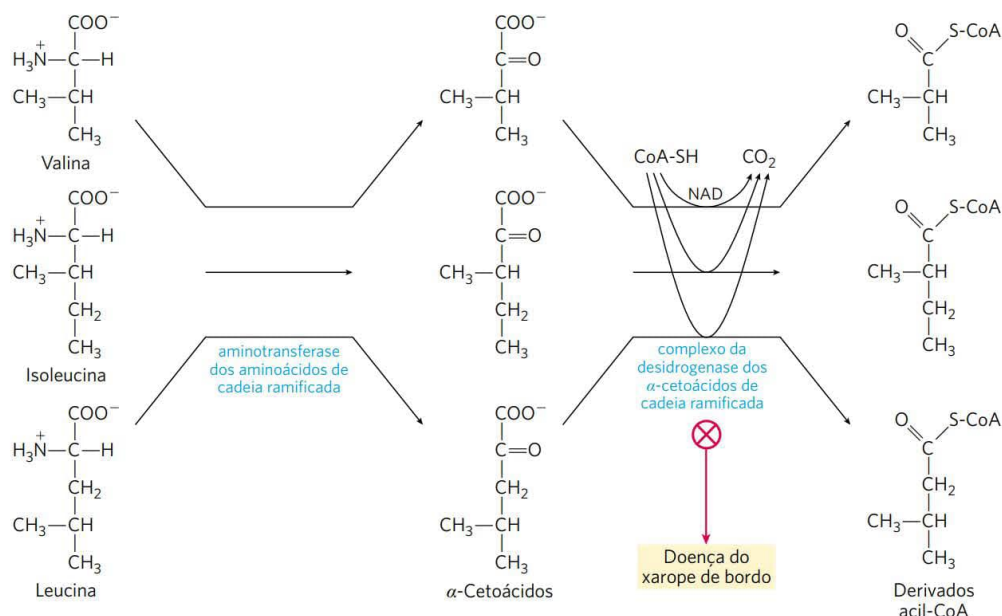


FIGURA 18-28 Rotas catabólicas para os três aminoácidos de cadeia ramificada: a valina, a isoleucina e a leucina. As três vias ocorrem em tecidos extra-hepáticos e compartilham as duas primeiras enzimas, conforme mostrado nesta figura. O complexo da desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada é análogo aos complexos da piruvato-desidrogenase e da α -cetoglutarato-desidrogenase e requer os mesmos cinco cofatores (alguns não são mostrados aqui). Essa enzima está deficiente em pacientes com a doença do xarope de bordo.

genase está sujeito a uma regulação semelhante por fosforilação e desfosforilação (p. 640).



Existe uma doença genética relativamente rara em que os três α -cetoácidos de cadeia ramificada (assim como seus aminoácidos precursores, principalmente a leucina) se acumulam no sangue, “extravasando” para a urina. Essa condição, denominada **doença do xarope de bordo** devido ao odor característico conferido à urina pelos α -cetoácidos, resulta de uma deficiência no complexo da desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada. Quando não tratada, a doença resulta em desenvolvimento anormal do encéfalo, deficiência intelectual e morte no início da infância. O tratamento inclui controle rígido da dieta, com limitação da ingestão de valina, isoleucina e leucina ao mínimo necessário para permitir um crescimento normal. ■

A asparagina e o aspartato são degradados em oxalacetato

Os esqueletos carbonados da **asparagina** e do **aspartato** entram, por fim, no ciclo do ácido cítrico como malato, nos mamíferos, ou como oxalacetato, nas bactérias. A enzima **asparaginase** catalisa a hidrólise da asparagina, produzindo aspartato, o qual sofre transaminação com o α -cetoglutarato, gerando glutamato e oxalacetato (**Figura 18-29**). O oxalacetato é convertido em malato no citosol e, então, transportado para a matriz mitocondrial pelo transportador malato- α -cetoglutarato. Em bactérias, o oxalacetato produzido na reação de transaminação pode ser utilizado diretamente no ciclo do ácido cítrico.

Até este ponto, foi estudado como os 20 aminoácidos proteicos, após perderem seus átomos de nitrogênio, são

degradados por desidrogenação, descarboxilação e por outras reações em que porções de seus esqueletos carbonados alcançam a forma de seis metabólitos centrais que podem entrar no ciclo do ácido cítrico. Aquelas porções degradadas até acetil-CoA são completamente oxidadas até dióxido de carbono e água, com produção de ATP pela fosforilação oxidativa.

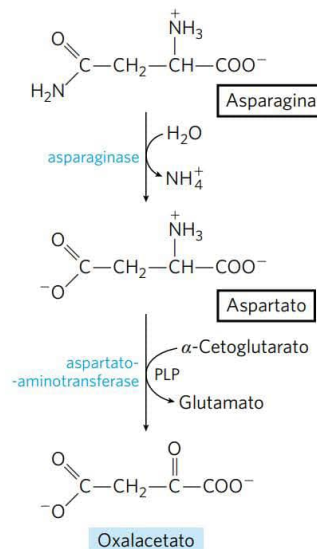


FIGURA 18-29 Rotas catabólicas para asparagina e aspartato. Ambos os aminoácidos são convertidos em oxalacetato.

QUADRO 18-2



MEDICINA

Detetives da ciência solucionam um assassinato misterioso

Às vezes, a verdade pode ser mais estranha que a ficção – ou, pelo menos, tão estranha quanto um filme. Observe, por exemplo, o caso de Patricia Stallings. Condenada pela morte de seu bebê, ela foi sentenciada à prisão perpétua – mas foi posteriormente inocentada, graças à investigação médica de três persistentes pesquisadores.

A história começou no verão de 1989, quando Stallings levou Ryan, seu filho de 3 meses de idade, à emergência do Cardinal Glennon Children's Hospital, em St. Louis. O bebê apresentava respiração difícil, vômitos incontroláveis e disfunções gástricas. De acordo com o médico que o atendeu, um toxicologista, os sintomas do bebê indicavam envenenamento por etilenoglicol, um ingrediente de anticongelantes, conclusão aparentemente confirmada pela análise em um laboratório comercial.

Após sua recuperação, o menino foi colocado em um lar adotivo, e Stallings e seu marido, David, podiam vê-lo apenas em visitas supervisionadas. No entanto, quando o bebê ficou doente e morreu após uma visita em que Stallings ficou sozinha com ele, ela foi acusada de assassinato em primeiro grau, sendo declarada prisão inafiançável. Na ocasião, as evidências pareciam contundentes, pois os dois laboratórios, o comercial e o do hospital, haviam encontrado grandes quantidades de etilenoglicol no sangue do menino e traços desse produto em uma mamadeira que Stallings havia utilizado para alimentá-lo durante sua visita.

Contudo, sem sabê-lo, Stallings havia realizado um experimento brilhante. Enquanto estava presa, descobriu que estava grávida; um tempo depois, ela deu à luz outro filho, David Stallings Jr., em fevereiro de 1990. Ele foi colocado imediatamente em um lar adotivo, porém, após duas semanas, começou a apresentar sintomas semelhantes aos de Ryan. David foi, por fim, diagnosticado com

uma rara doença metabólica denominada acidemia metilmalônica (MMA, do inglês, *methylmalonic acidemia*). Essa doença, distúrbio genético recessivo do metabolismo dos aminoácidos, afeta cerca de 1 em 48.000 recém-nascidos e apresenta sintomas quase idênticos àqueles causados por envenenamento por etilenoglicol.

Stallings não poderia ter envenenado seu segundo filho, mas a procuradoria do Estado do Missouri não ficou impressionada com esse novo fato e prosseguiu com o julgamento. A corte não permitiu que o diagnóstico de MMA do segundo filho fosse apresentado como evidência e, em janeiro de 1991, Patricia Stallings foi condenada por agressão com arma letal e sentenciada à prisão perpétua.

Felizmente para Stallings, no entanto, William Sly, professor do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade de St. Louis, e James Shoemaker, chefe de um laboratório de triagem metabólica da Universidade, interessaram-se por esse caso quando souberam dele em uma reportagem de televisão. Shoemaker realizou suas próprias análises do sangue de Ryan e não detectou etilenoglicol. Ele e Sly, então, contataram Piero Rinaldo, especialista em doenças metabólicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Yale, cujo laboratório estava equipado para diagnosticar MMA a partir de amostras de sangue.

Quando Rinaldo analisou o soro sanguíneo de Ryan, encontrou altas concentrações de ácido metilmalônico, produto da degradação dos aminoácidos de cadeia ramificada isoleucina e valina, que se acumula em pacientes com MMA, pois a enzima que devia convertê-lo no próximo produto da via metabólica está defeituosa (Figura Q-1). E, fato especialmente expressivo: o sangue e a urina da criança continham quantidades enormes de cetonas, outra consequência metabólica da doença. Assim

Da mesma forma que ocorre com carboidratos e lipídeos, a degradação dos aminoácidos resulta, ao final, na produção de equivalentes redutores (NADH e FADH_2) pela ação do ciclo do ácido cítrico. O estudo dos processos catabólicos será concluído no próximo capítulo com uma discussão sobre a respiração, em que os equivalentes redutores alimentam o processo fundamental de oxidação e geração de energia nos organismos aeróbicos.

RESUMO 18.3 Rotas de degradação dos aminoácidos

- Após a remoção dos grupos amina, os esqueletos carbonados dos aminoácidos sofrem oxidação a compostos capazes de entrar no ciclo do ácido cítrico para oxidação a CO_2 e H_2O . As reações dessas rotas necessitam de diversos cofatores, incluindo o tetra-hidrofolato e a *S*-adenosilmetionina, em reações de transferência de um carbono, e a tetra-hidrobipterina, na oxidação da fenilalanina pela fenilalanina-hidroxilase.
- Dependendo de seu produto final de degradação, alguns aminoácidos podem ser convertidos em corpos cetônicos, alguns em glicose e alguns em ambos. Assim, a

degradação dos aminoácidos está integrada ao metabolismo intermediário, podendo ser crucial para a sobrevivência em condições nas quais os aminoácidos são uma fonte significativa de energia metabólica.

- Os esqueletos carbonados dos aminoácidos entram no ciclo do ácido cítrico por meio de cinco intermediários: acetil-CoA, α -cetoglutarato, succinil-CoA, fumarato e oxalacetato. Alguns são degradados em piruvato, que pode ser convertido em acetil-CoA ou em oxalacetato.
- Os aminoácidos que produzem piruvato são a alanina, a cisteína, a glicina, a serina, a treonina e o triptofano. A leucina, a lisina, a fenilalanina e o triptofano produzem acetil-CoA, via acetoacetil-CoA. A isoleucina, a leucina, a treonina e o triptofano também produzem acetil-CoA diretamente.
- A arginina, o glutamato, a glutamina, a histidina e a prolina produzem α -cetoglutarato; a isoleucina, a metionina, a treonina e a valina produzem succinil-CoA; quatro átomos de carbono da fenilalanina e da tirosina levam à produção de fumarato; a asparagina e o aspartato produzem oxalacetato.

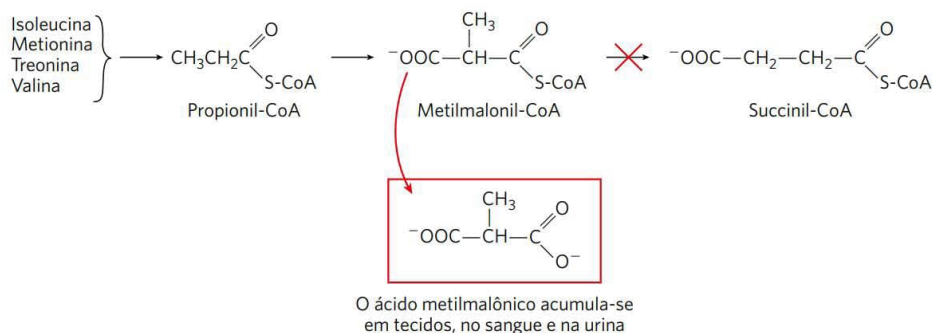


FIGURA Q-1 Crianças com uma mutação (X em vermelho) que inativa a enzima metilmalonil-CoA-mutase não degradam normalmente os aminoácidos isoleucina, metionina, treonina e valina. Ocorre um acúmulo potencialmente fatal de ácido metilmalônico, com sintomas semelhantes aos do envenenamento por etilenoglicol.

como Shoemaker, ele não encontrou nenhum etilenoglicol em uma amostra dos fluidos corporais do bebê. A mamadeira não pôde ser testada, uma vez que havia desaparecido misteriosamente. A análise de Rinaldo o convenceu de que Ryan havia morrido em consequência de MMA, mas como explicar os resultados de dois laboratórios que indicavam que o menino apresentava etilenoglicol em seu sangue? Será que os dois poderiam estar errados?

Quando Rinaldo obteve os dois relatos dos laboratórios, o que viu, afirmou ele, “foi assustador”. Um dos laboratórios havia concluído que o sangue de Ryan Stallings continha etilenoglicol, mesmo que a análise da amostra de sangue não apresentasse o perfil do próprio laboratório para uma amostra-padrão contendo etilenoglicol. “Não era apenas um problema de interpretação questionável. A qualidade da análise era inaceitável”,

observou Rinaldo. E o segundo laboratório? De acordo com Rinaldo, o laboratório detectou um componente anormal no sangue de Ryan e apenas “presumiu que fosse etilenoglicol”. As amostras da mamadeira não mostraram nada fora do comum, disse Rinaldo, e ainda assim o laboratório também declarou haver nela evidências de etilenoglicol.

Rinaldo apresentou seus achados ao procurador do caso, George McElroy, que convocou uma coletiva de imprensa no dia seguinte. “Não acredito mais nos dados dos laboratórios”, ele disse aos jornalistas. Tendo concluído que, ao fim das contas, Ryan Stallings havia morrido de MMA, McElroy retirou todas as acusações contra Patricia Stallings em 20 de setembro de 1991.

Por Michelle Hoffman, *Science* 253:931, 1991. Direitos autorais da American Association for the Advancement of Science, 1991.

- Os aminoácidos de cadeia ramificada (isoleucina, leucina e valina), diferentemente dos demais aminoácidos, são degradados apenas em tecidos extra-hepáticos.
- Diversas doenças humanas graves são causadas por defeitos genéticos nas enzimas do catabolismo dos aminoácidos.

Termos-chave

Termos em negrito estão definidos no glossário.

aminotransferases 679	glutaminase 682
transaminases 679	ciclo da glicose-alanina 682
transaminação 679	amoniótico 684
piridoxal-fosfato (PLP) 679	ureotélico 684
desaminação oxidativa 680	uricotélico 684
L-glutamato-desidrogenase 680	ciclo da ureia 684
glutamina-sintetase 682	ureia 684
	creatina-cinase 688

aminoácidos essenciais 689
cetogênico 691
glicogênico 691
tetra-hidrofolato 691
S-adenosilmetionina (adoMet) 692

tetra-hidrobiopterina 694
 fenilcetonúria (PKU) 697
oxidases de função mista 697
 alcaptonúria 700
 doença do xarope de bordo 703

Teste seu conhecimento

1. Produtos da transaminação dos aminoácidos Nomeie e desenhe a estrutura dos α -cetoácidos que resultam quando cada um dos seguintes aminoácidos sofre transaminação com o α -cetoglutarato: (a) aspartato, (b) glutamato, (c) alanina, (d) fenilalanina.

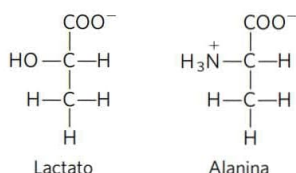
2. Avaliação da atividade da alanina-aminotransferase A atividade (velocidade da reação) da alanina-aminotransferase é medida, geralmente, incluindo ao sistema reacional um excesso de lactato-desidrogenase pura e de NADH. A velocidade de desaparecimento da alanina é igual à velocidade de desapa-

recimento do NADH, medida por espectrofotometria. Explique como funciona esse ensaio.

3. A alanina e a glutamina no sangue O plasma sanguíneo humano normal contém todos os aminoácidos necessários para a síntese das proteínas teciduais, mas não em iguais concentrações. A alanina e a glutamina estão presentes em concentrações muito mais elevadas que os demais aminoácidos. Sugira uma razão.

4. Distribuição do nitrogênio amínico Se sua dieta é rica em alanina, mas deficiente em aspartato, você apresentará sinais de deficiência em aspartato? Explique.

5. Lactato versus alanina como combustível metabólico: o custo da remoção do nitrogênio Os três carbonos do lactato e da alanina apresentam estados de oxidação idênticos, e os animais podem usar qualquer uma dessas fontes de carbono como combustível metabólico. Compare a produção líquida de ATP (moles de ATP por mol de substrato) para a oxidação completa (a CO_2 e H_2O) de lactato versus alanina quando o custo da excreção de nitrogênio como ureia é incluído.



6. Toxicidade da amônia como resultado de uma dieta deficiente em arginina Em um estudo realizado alguns anos atrás, gatos foram submetidos a um jejum durante a noite e então receberam uma única refeição, completa com todos os aminoácidos, com exceção da arginina. Dentro de duas horas, os níveis de amônia no sangue aumentaram dos níveis normais de $18 \mu\text{g/L}$ para $140 \mu\text{g/L}$, e os gatos mostraram sintomas clínicos de intoxicação por amônia. Um grupo-controle recebeu uma dieta contendo todos os aminoácidos ou uma dieta em que a arginina era substituída pela ornitina e não mostrou qualquer sintoma clínico incomum.

- Qual a razão do jejum no experimento?
- Qual a causa do aumento dos níveis de amônia no grupo experimental? Por que a ausência de arginina levou à intoxicação pela amônia? A arginina é um aminoácido essencial para os gatos? Sim ou não? Por quê?
- Por que a ornitina pode substituir a arginina?

7. Oxidação do glutamato Escreva uma série de equações balanceadas e uma equação geral para a reação global, descrevendo a oxidação de 2 moles de glutamato em 2 moles de α -cetoglutarato e 1 mol de ureia.

8. Transaminação e o ciclo da ureia A aspartato-amino-transferase apresenta a maior atividade, entre todas as aminotransferases do fígado de mamíferos. Por quê?



9. O caso contra a dieta da proteína líquida

Uma dieta para a redução do peso fortemente promovida alguns anos atrás propunha a ingestão diária de “proteína líquida” (sopa de gelatina hidrolisada), água e uma seleção de vitaminas. Os demais alimentos e bebidas deveriam ser evitados. Pessoas utilizando essa dieta perdiam, geralmente, 4 a 6 kg na primeira semana.

- Pessoas contrárias a essa dieta argumentavam que a perda de peso era quase que inteiramente devida à perda de água e que o peso perdido logo seria repostado, após a pessoa

voltar a utilizar uma dieta normal. Qual a base bioquímica para esse argumento?

- Algumas pessoas morreram durante a utilização dessa dieta. Quais os riscos inerentes a essa dieta e como podem levar à morte?

10. Aminoácidos cetogênicos Quais aminoácidos são exclusivamente cetogênicos?



11. Um defeito genético no metabolismo dos aminoácidos: história de caso

Uma criança de 2 anos de idade foi levada ao hospital. Sua mãe contou que ela vomitava com frequência, especialmente após as refeições. O peso da criança e seu desenvolvimento físico estavam aquém do normal. Seu cabelo, embora escuro, continha mechas esbranquiçadas. Uma amostra de urina foi tratada com cloreto férrico (FeCl_3) e produziu a cor verde característica da presença de fenilpiruvato. A análise quantitativa de amostras de urina produziu os resultados mostrados na tabela a seguir.

Substância	Concentração (mm)	
	Urina do paciente	Urina normal
Fenilalanina	7,0	0,01
Fenilpiruvato	4,8	0
Fenil-lactato	10,3	0

- Sugira qual enzima pode estar deficiente nesta criança. Proponha um tratamento.
- Por que a fenilalanina aparece na urina em grandes quantidades?
- Qual a origem do fenilpiruvato e do fenil-lactato? Por que essa rota (normalmente não funcional) é acionada quando a concentração de fenilalanina aumenta?
- Por que os cabelos da criança contêm mechas esbranquiçadas?



12. Papel da cobalamina no catabolismo dos aminoácidos

A anemia perniciosa é causada por prejuízo na absorção de vitamina B_{12} . Qual o efeito desse prejuízo sobre o catabolismo dos aminoácidos? Todos os aminoácidos são igualmente afetados? (Dica: ver Quadro 17-2.)



13. Dietas vegetarianas

Dietas vegetarianas podem fornecer altos níveis de antioxidantes e um perfil lipídico que pode ajudar a prevenir doença coronariana. Contudo, alguns problemas associados podem advir. Amostras sanguíneas foram colhidas de um grande grupo de participantes voluntários que eram veganos (vegetarianos estritos: não consomem qualquer produto de origem animal), lactovegetarianos (vegetarianos que consomem laticínios) ou omnívoros (pessoas com dieta variada, incluindo carne). Todos os participantes haviam seguido sua dieta por diversos anos. Os níveis sanguíneos de homocisteína e metilmalonato estavam elevados no grupo de vegetarianos estritos, um pouco mais baixos no grupo de lactovegetarianos e bem mais baixos no grupo omnívoro. Explique.

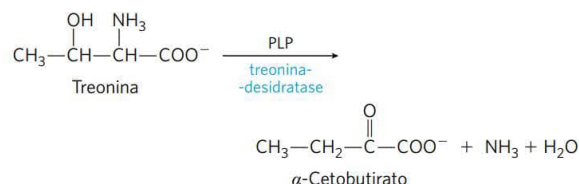


14. Anemia perniciosa

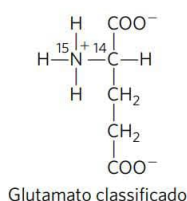
A deficiência de vitamina B_{12} pode ser causada por raras doenças genéticas que levam a níveis diminuídos de vitamina B_{12} apesar de uma dieta normal, que inclui carne e laticínios, ricos em B_{12} . Essas condições não podem ser tratadas com suplementos de vitamina B_{12} . Explique.

15. Mecanismos de reação do piridoxal-fosfato A treonina pode ser clivada pela enzima treonina-desidratase, que catalisa a conversão de treonina em α -cetobutirato e amônia. A enzima utiliza piridoxal-fosfato como cofator. Sugira um me-

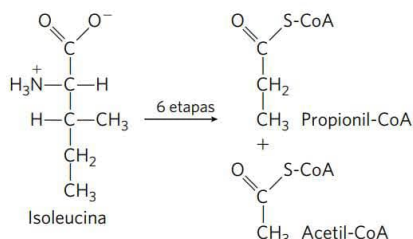
canismo para essa reação, com base nos mecanismos mostrados na Figura 18-6. Observe que essa reação inclui uma eliminação no carbono β da treonina.



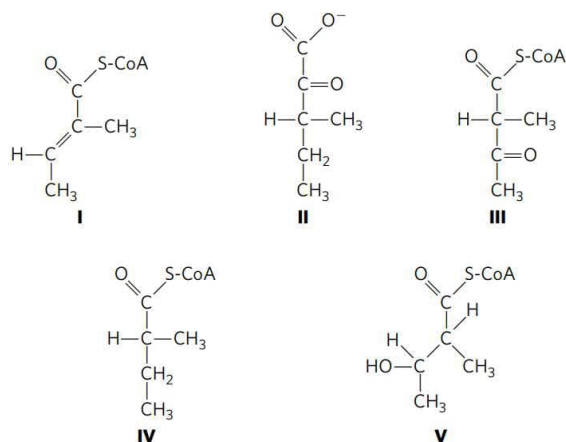
16. Rotas para o carbono e para o nitrogênio no metabolismo do glutamato Quando $[2\text{-}^{14}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ glutamato sofre degradação oxidativa no fígado de um rato, em quais átomos dos seguintes metabólitos será encontrado cada um dos isótopos? (a) ureia, (b) succinato, (c) arginina, (d) citrulina, (e) ornitina, (f) aspartato



17. Estratégia química para o catabolismo da isoleucina A isoleucina é degradada por meio de seis etapas, produzindo propionil-CoA e acetil-CoA.



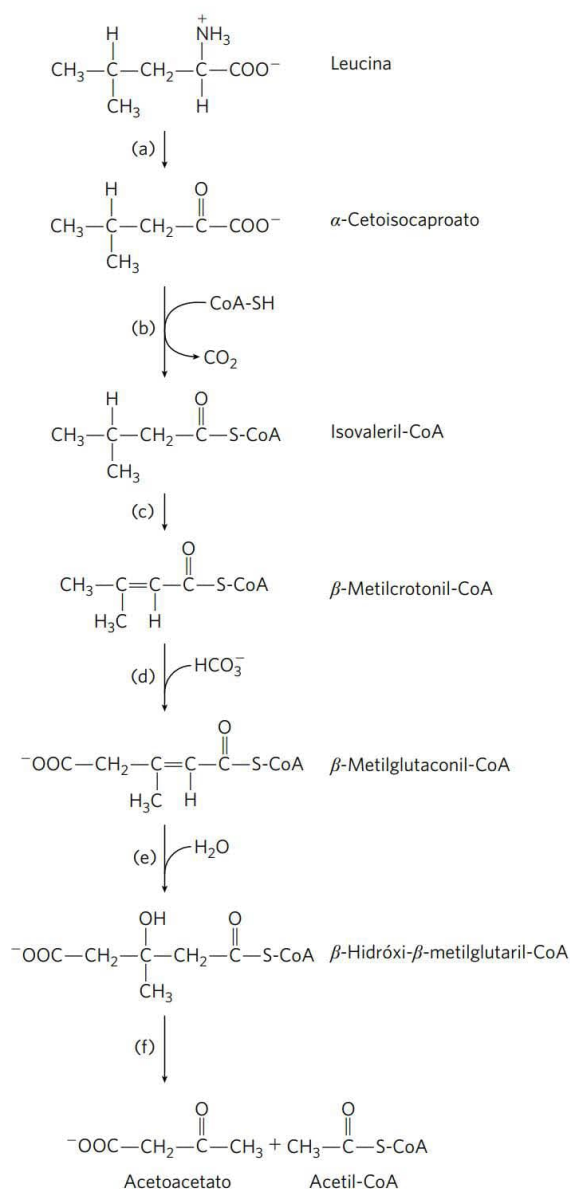
(a) O processo químico da degradação da isoleucina inclui estratégias análogas àquelas utilizadas no ciclo do ácido cítrico e na β -oxidação dos ácidos graxos. Os intermediários da degradação da isoleucina (I a V), mostrados a seguir, não estão na ordem correta. Utilize seu conhecimento e sua compreensão do ciclo do ácido cítrico e da via de β -oxidação para colocar em ordem os intermediários na sequência metabólica apropriada para a degradação da isoleucina.



(b) Para cada etapa que você propõe, descreva o processo químico, forneça um exemplo análogo a partir do ciclo do ácido cítrico ou da via de β -oxidação (onde possível) e indique os cofatores necessários.

18. Papel do piridoxal-fosfato no metabolismo da glicina A enzima serina-hidroximetil-transferase requer piridoxal-fosfato como seu cofator. Proponha um mecanismo para a reação catalisada por essa enzima, no sentido da degradação da serina (produção de glicina). (Dica: ver Figuras 18-19 e 18-20b.)

19. Vias paralelas para a degradação de aminoácidos e de ácidos graxos O esqueleto carbonado da leucina é degradado por uma série de reações bastante análogas àquelas do ciclo do ácido cítrico e da rota de β -oxidação. Para cada reação, de (a) a (f), mostrada a seguir, indique o tipo de reação, forneça um exemplo análogo a partir do ciclo do ácido cítrico ou da rota de β -oxidação (onde possível) e indique os cofatores necessários.





20. Tratamentos para uma doença genética

Controles dietéticos rígidos necessários para interromper o progresso da doença do xarope de bordo são difíceis de serem seguidos durante toda a vida, e os pacientes podem apresentar um controle metabólico prejudicado, que leva a sintomas neurológicos. Nesses casos, o tratamento pode envolver transplante de órgão a partir de um doador adequado. O transplante de órgãos envolve risco considerável, mas seu sucesso pode melhorar bastante os sintomas dessa doença metabólica e reduzir a necessidade de controles dietéticos estritos. Que órgão poderia ser transplantado para se obter este efeito e por quê?

Problema de análise de dados



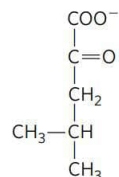
21. Doença do xarope de bordo

A Figura 18-28 mostra a rota para a degradação dos aminoácidos de cadeia ramificada e o sítio do defeito bioquímico que causa a doença do xarope de bordo. Os achados iniciais que, por fim, levaram à descoberta desse defeito foram apresentados em três artigos publicados no fim da década de 1950 e no início da década de 1960. Este problema conta a história dos achados, desde as observações clínicas iniciais até a proposta de um mecanismo bioquímico.

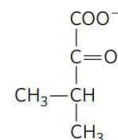
Menkes, Hurst e Craig (1954) apresentaram os casos de quatro irmãos, os quais morreram após um curso similar de sintomas. Em todos os quatro casos, a gestação e o nascimento foram normais. Os primeiros 3 a 5 dias de vida de cada criança também foram normais. Logo após, porém, cada criança começou a apresentar convulsões, e as crianças morreram entre as idades de 11 dias e 3 meses. A necropsia mostrou, em todos

os casos, considerável edema do encéfalo. A urina das crianças apresentava um odor forte e incomum de “xarope de bordo”, iniciando ao redor do terceiro dia de vida.

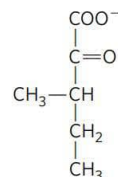
Menkes (1959) relatou dados coletados de seis outras crianças. Todas apresentaram sintomas semelhantes àqueles descritos anteriormente e morreram entre 15 dias e 20 meses após o nascimento. Em um dos casos, Menkes conseguiu obter amostras de urina durante os últimos meses de vida do bebê. Quando ele tratou a urina com 2,4-dinitrofenil-hidrazona, que forma um precipitado colorido com compostos cetônicos, ele descobriu três α -cetoácidos em quantidades anormalmente altas:



α -Cetoisocaproato



α -Cetoisovalerato



α -Ceto- β -metil- n -valerato

- (a) Esses α -cetoácidos são produzidos pela desaminação de aminoácidos. Para cada um dos α -cetoácidos acima, desenhe e nomeie o aminoácido do qual ele é derivado.

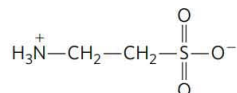
Resultados da análise de seu sangue e urina são mostrados na tabela a seguir, juntamente com os valores normais para cada composto.

Dancis, Levitz e Westall (1960) coletaram dados adicionais, que os levaram a propor o defeito bioquímico mostrado na Figura 18-28. Em um dos casos, eles examinaram

Aminoácido(s)	Concentração na urina (mg/24 h)			Concentração no plasma (mg/mL)	
	Normal	Paciente		Normal	Paciente
		Março 1956	Janeiro 1957		Janeiro 1957
Alanina	5-15	0,2	0,4	3,0-4,8	0,6
Asparagina e glutamina	5-15	0,4	0	3,0-5,0	2,0
Ácido aspártico	1-2	0,2	1,5	0,1-0,2	0,04
Arginina	1,5-3	0,3	0,7	0,8-1,4	0,8
Cistina	2-4	0,5	0,3	1,0-1,5	0
Ácido glutâmico	1,5-3	0,7	1,6	1,0-1,5	0,9
Glicina	20-40	4,6	20,7	1,0-2,0	1,5
Histidina	8-15	0,3	4,7	1,0-1,7	0,7
Isoleucina	2-5	2,0	13,5	0,8-1,5	2,2
Leucina	3-8	2,7	39,4	1,7-2,4	14,5
Lisina	2-12	1,6	4,3	1,5-2,7	1,1
Metionina	2-5	1,4	1,4	0,3-0,6	2,7
Ornitina	1-2	0	1,3	0,6-0,8	0,5
Fenilalanina	2-4	0,4	2,6	1,0-1,7	0,8
Prolina	2-4	0,5	0,3	1,5-3,0	0,9
Serina	5-15	1,2	0	1,3-2,2	0,9
Taurina	1-10	0,2	18,7	0,9-1,8	0,4
Treonina	5-10	0,6	0	1,2-1,6	0,3
Triptofano	3-8	0,9	2,3	Não medido	0
Tirosina	4-8	0,3	3,7	1,5-2,3	0,7
Valina	2-4	1,6	15,4	2,0-3,0	13,1

um paciente cuja urina apresentou pela primeira vez odor de xarope de bordo quando ele tinha 4 meses de idade. Com 10 meses de idade (março de 1956), o bebê foi internado em um hospital por apresentar febre e desenvolvimento motor bastante retardado. Com a idade de 20 meses (janeiro de 1957), voltou a ser internado, e descobriu-se que apresentava sintomas de degeneração neurológica semelhantes aos observados previamente em casos da doença do xarope de bordo; ele morreu pouco tempo após.

- (b) A tabela inclui a taurina, aminoácido normalmente não encontrado em proteínas. A taurina frequentemente é produzida como produto colateral de dano celular. Sua estrutura é:



Com base nessa estrutura e na informação contida neste capítulo, qual aminoácido é, mais provavelmente, o precursor da taurina? Explique o raciocínio utilizado.

- (c) Em comparação com os valores normais fornecidos na tabela, quais aminoácidos mostraram níveis significativamente elevados no sangue do paciente em janeiro de 1957? Quais estavam elevados na urina?

Com base em seus resultados e no conhecimento que tinham da via mostrada na Figura 18-28, Dancis e colaboradores concluíram que “embora pareça provável para os autores que o bloqueio primário esteja na via de degradação de aminoácidos de cadeia ramificada, isso não pode ser considerado estabelecido de modo inquestionável”.

- (d) Como os dados aqui apresentados apoiam essa conclusão?
 (e) Quais dados aqui apresentados *não* se ajustam a esse modelo da doença do xarope de bordo? Como você explica esses dados aparentemente contraditórios?
 (f) Que dados você precisaria coletar para estar mais seguro em sua conclusão?

Referências

- Dancis, J., M. Levitz e R. Westall. 1960.** Maple syrup urine disease: branched-chain ketoaciduria. *Pediatrics* 25:72–79.
Menkes, J.H. 1959. Maple syrup disease: isolation and identification of organic acids in the urine. *Pediatrics* 23:348–353.
Menkes, J.H., P.L. Hurst e J.M. Craig. 1954. A new syndrome: progressive familial infantile cerebral dysfunction associated with an unusual urinary substance. *Pediatrics* 14:462–466.

Esta página foi deixada em branco intencionalmente.

Fosforilação oxidativa

- 19.1 A cadeia respiratória mitocondrial 712
- 19.2 Síntese de ATP 728
- 19.3 Regulação da fosforilação oxidativa 741
- 19.4 Mitocôndrias na termogênese, na síntese de esteroides e na apoptose 744
- 19.5 Genes mitocondriais: suas origens e efeitos das mutações 746

A fosforilação oxidativa é o ápice do metabolismo produtor de energia (catabolismo) em organismos aeróbicos. Todos os passos oxidativos na degradação de carboidratos, gorduras e aminoácidos convergem para esse estágio final da respiração celular, onde a energia da oxidação propicia a síntese de ATP. A fosforilação oxidativa é responsável pela maior parte do ATP sintetizado por organismos não fotossintéticos na maior parte das circunstâncias. Nos eucariotos, a fosforilação oxidativa ocorre na mitocôndria e envolve enormes complexos proteicos embebidos nas membranas mitocondriais. A via para a síntese de ATP na mitocôndria desafiou e fascinou bioquímicos durante a maior parte do século XX.

O entendimento atual sobre a síntese de ATP em mitocôndrias tem como base a teoria, introduzida por Peter Mitchell em 1961, de que as diferenças transmembrana na concentração de prótons servem de reservatório para a energia extraída das reações biológicas de oxidação. A **teoria quimiosmótica** foi aceita como um dos grandes princípios unificadores da biologia do século XX. Ela fornece uma visão dos processos de fosforilação oxidativa e de fotofosforilação nas plantas, assim como de processos de transdução de energia aparentemente diferentes, como o transporte ativo através de membranas e o movimento de flagelos de bactérias.

O mecanismo da fosforilação oxidativa apresenta três componentes que o definem (**Figura 19-1**). (1) Há fluxo de elétrons a partir de doadores de elétrons (substratos oxidáveis) através de uma cadeia de carreadores ligados à membrana até um receptor final de elétrons com um grande potencial de redução (o oxigênio molecular, O_2). (2) A energia livre que se torna disponível por esse fluxo de elétrons “montanha abaixo” (exergônico) é acoplada ao transporte

“montanha acima” de prótons através de uma membrana impermeável a prótons, conservando a energia livre da oxidação do combustível na forma de um potencial eletroquímico transmembrana (p. 406). (3) O fluxo transmembrana de retorno dos prótons a favor de seu gradiente de concentração por canais proteicos específicos fornece a energia livre para a síntese de ATP, catalisada por um complexo pro-

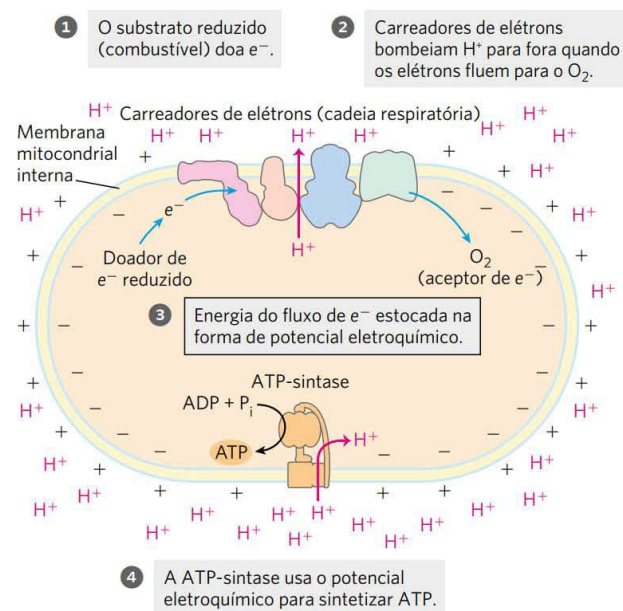


FIGURA 19-1 O mecanismo quimiosmótico para a síntese de ATP na mitocôndria. Os elétrons movem-se por uma cadeia de transportadores ligados a membranas (a cadeia respiratória) espontaneamente, governados pelo alto potencial de redução do oxigênio e pelos potenciais de redução relativamente baixos dos diversos substratos reduzidos (combustível) que sofrem oxidação na mitocôndria. O fluxo de elétrons cria um potencial eletroquímico pelo movimento transmembrana de prótons e carga positiva. Esse potencial eletroquímico fornece energia para a síntese de ATP que ocorre por meio de uma enzima de membrana, a ATP-sintase, fundamentalmente similar em mitocôndrias e cloroplastos, assim como em bactérias e arqueobactérias.

teico presente na membrana (ATP-sintase), que acopla o fluxo de prótons à fosforilação do ADP.

Neste capítulo, são inicialmente descritos os componentes da cadeia de transferência de elétrons – a cadeia respiratória, sua organização em grandes complexos funcionais na membrana mitocondrial interna, a via de fluxo de elétrons por eles e os movimentos de prótons que acompanham esse fluxo. Depois, são abordados o notável complexo enzimático que, por catálise rotacional, captura a energia do fluxo de prótons na forma de ATP e os mecanismos regulatórios que coordenam a fosforilação oxidativa com as várias vias catabólicas pelas quais os combustíveis são oxidados.

O papel metabólico das mitocôndrias é tão crucial para o funcionamento da célula e do organismo que defeitos na função mitocondrial têm consequências médicas muito sérias. As mitocôndrias são centrais para as funções neuronal e muscular e para a regulação do metabolismo energético do corpo como um todo e do peso corporal. Doenças humanas neurodegenerativas, bem como câncer, diabetes e obesidade são reconhecidos como possíveis resultados do comprometimento da função mitocondrial, e uma teoria de envelhecimento baseia-se na perda gradual da integridade mitocondrial. A produção de ATP não é a única função importante da mitocôndria; essa organela também age na termogênese, na síntese de esteroides e na apoptose (morte celular programada). A descoberta dessas funções variadas e importantes das mitocôndrias estimulou uma boa parte da pesquisa atual sobre a bioquímica dessa organela. Serão consideradas essas distintas funções da mitocôndria e as consequências de defeitos na funcionalidade das mitocôndrias em seres humanos.

19.1 A cadeia respiratória mitocondrial

A descoberta, em 1948, por Eugene Kennedy e Albert Lehninger de que as mitocôndrias são os locais da fosforilação oxidativa em eucariotos marcou o início da fase moderna dos estudos enzimológicos de transduções biológicas de energia. As mitocôndrias, assim como as bactérias gram-negativas, têm duas membranas

(Figura 19-2a). A membrana mitocondrial externa é prontamente permeável a moléculas pequenas ($M_r < 5.000$) e a íons, que se movem livremente por canais transmembrana formados por uma família de proteínas integrais de membrana, chamadas de porinas. A membrana interna é impermeável à maioria das moléculas pequenas e dos íons, incluindo prótons (H^+); as únicas espécies que cruzam essa membrana o fazem por meio de transportadores específicos. A membrana interna aloja os componentes da cadeia respiratória e a ATP-sintase.



Albert L. Lehninger, 1917-1986
[Fonte: Arquivos Médicos Alan Mason Chesney das Instituições Médicas Johns Hopkins.]

A matriz mitocondrial, delimitada pela membrana interna, contém o complexo da piruvato-desidrogenase e as enzimas do ciclo do ácido cítrico, a via de β -oxidação de ácidos graxos e as vias de oxidação de aminoácidos – todas as vias de oxidação de combustível, exceto a glicólise, que ocorre no citosol. A permeabilidade seletiva da membrana interna segrega os intermediários e as enzimas das vias metabólicas citosólicas daqueles dos processos metabólicos que ocorrem na matriz. No entanto, transportadores específicos carregam piruvato, ácidos graxos e aminoácidos ou seus α -cetoácidos derivados para dentro da matriz, para acesso à maquinaria do ciclo do ácido cítrico. ADP e P_i são especificamente transportados para dentro da matriz quando ATP recém-sintetizado é transportado para fora. O melhor inventário atual de proteínas em mitocôndrias de mamíferos lista cerca de 1.100, das quais pelo menos 300 têm funções desconhecidas.

A representação de mitocôndrias em forma de feijão na Figura 19-2a é uma grande simplificação, derivada, em parte, de estudos antigos, nos quais finas secções de células eram observadas em microscópio eletrônico. Imagens tridimensionais obtidas, ou por reconstrução a partir de secções seriadas ou por microscopia confocal, revelam uma variação maior no tamanho e na forma mitocondriais. Em células vivas coradas com corantes fluorescentes específicos de mitocôndria, são vistos grandes números de mitocôndrias de formas variadas, aglomeradas perto do núcleo (ver Figura 19-2b).

Os tecidos com uma grande demanda por metabolismo aeróbico (p. ex., cérebro, músculos esquelético e do coração e olho) contêm muitas centenas ou milhares de mitocôndrias por célula, e, em geral, as mitocôndrias das células com grande atividade metabólica têm cristas em maior número e mais densamente empacotadas (Figura 19-2c, d). Durante o crescimento e a divisão celulares, as mitocôndrias dividem-se por fissão (como as bactérias), e, sob algumas circunstâncias, as mitocôndrias individuais fundem-se para formar estruturas maiores e mais distendidas. Sob condições estressantes, como na presença de inibidores do transporte de elétrons ou em certas mutações em um transportador de elétrons, a fissão mitocondrial é desencadeada e, às vezes, a **mitofagia** – degradação da mitocôndria com reciclagem dos aminoácidos, nucleotídeos e lipídeos liberados. À medida que o estresse diminui, mitocôndrias pequenas e curtas fundem-se para formar organelas tubulares longas e finas.

Elétrons são canalizados para aceptores universais de elétrons

A fosforilação oxidativa começa com a entrada de elétrons em uma série de transportadores de elétrons, chamada de **cadeia respiratória**. A maioria desses elétrons surge da ação das desidrogenases, que coletam elétrons das vias catabólicas e os canalizam para aceptores universais de elétrons – nucleotídeos de nicotinamida (NAD^+ ou $NADP^+$) ou nucleotídeos de flavina (FMN ou FAD) (ver Figuras 13-24, 13-27).

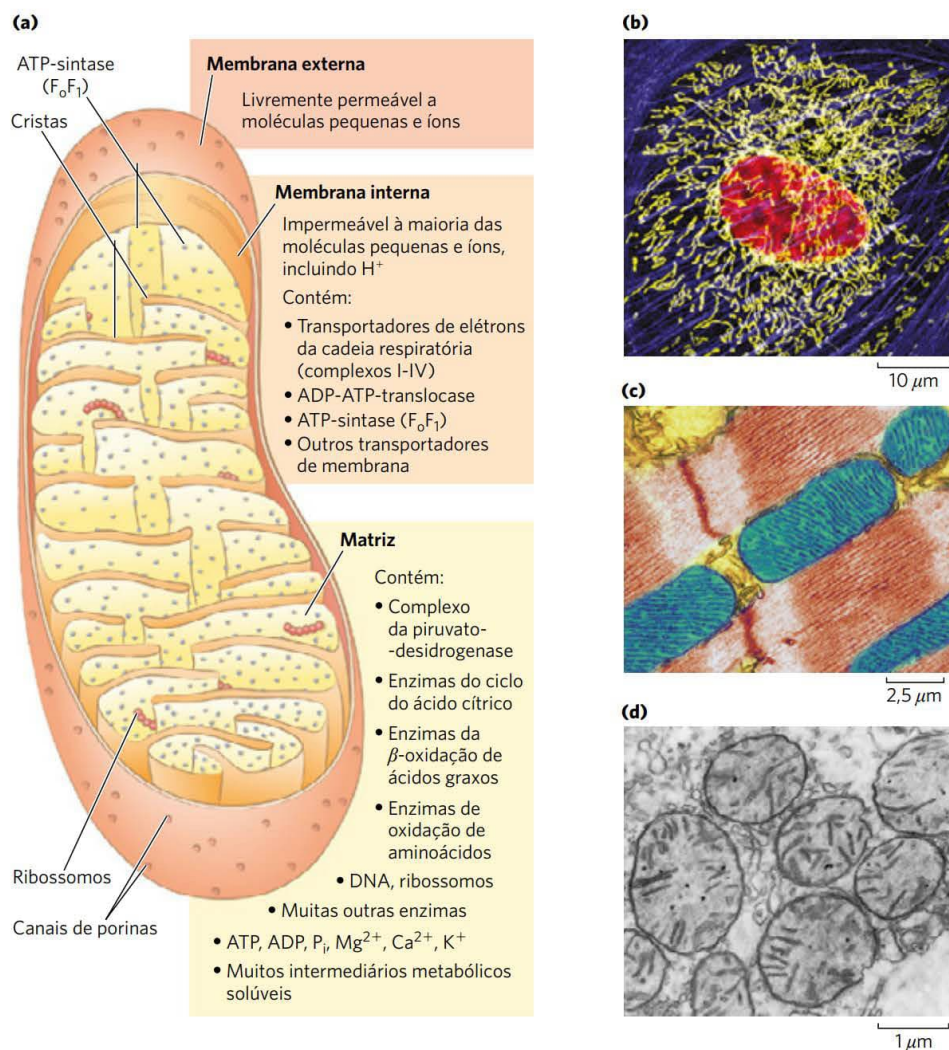
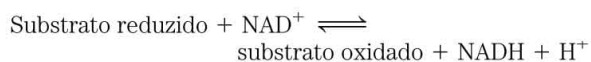


FIGURA 19-2 Anatomia bioquímica de uma mitocôndria. (a) A membrana externa tem poros que a tornam permeável a moléculas pequenas e íons, mas não a proteínas. As convoluções (cristas) da membrana interna fornecem uma grande superfície. A membrana interna de uma única mitocôndria hepática pode ter mais de 10 mil conjuntos de sistemas de transferência de elétrons (cadeias respiratórias) e de moléculas de ATP-sintase distribuídos na superfície da membrana. (b) Uma célula animal típica tem centenas ou milhares de mitocôndrias. Esta célula endotelial de artéria pulmonar bovina foi corada com sondas fluorescentes para actina (em azul), DNA (em vermelho) e mitocôndrias (em amarelo). Observe a variabilidade no comprimento das mitocôndrias. (c) As mitocôndrias do músculo cardíaco (em azul nesta micrografia eletrônica colorida), que têm cristas mais profundas e, assim, uma área muito maior de membrana interna, contêm mais de três vezes o número de conjuntos de sistemas de transferência de elétrons que as (d) mitocôndrias do fígado. As mitocôndrias dos músculos e do fígado têm tamanho aproximado ao de uma bactéria — 1 a $10\ \mu m$ de comprimento. As mitocôndrias de invertebrados, de plantas e de microrganismos eucarióticos são semelhantes às aquelas aqui mostradas, mas com variações muito maiores no tamanho, na forma e no grau de convoluções da membrana interna. [Fontes: (b) Talley Lambert/Science Source. (c) Thomas Deerinck, NC-MIR/Science Source. (d) Biophoto Associates/ Science Source.]

As **desidrogenases ligadas a nucleotídeos de nicotinamida** catalisam reações reversíveis dos seguintes tipos gerais:



A maioria das desidrogenases que agem no catabolismo é específica para NAD^+ comoceptor de elétrons (Tabela 19-1). Algumas estão no citosol, outras estão nas mitocôndrias e, ainda, outras têm isoenzimas mitocondriais e citosólicas.

As desidrogenases ligadas ao NAD removem dois átomos de hidrogênio de seus substratos. Um deles é transferido como íon hidreto ($:H^-$) ao NAD^+ ; o outro é liberado como H^+ no meio (ver Figura 13-24). NADH e NADPH são

TABELA 19-1 Algumas reações importantes catalisadas por desidrogenases ligadas a NAD(P)H

Reação ^a	Localização ^b
Ligadas ao NAD	
α -Cetoglutarato + CoA + NAD ⁺ \rightleftharpoons succinil-CoA + CO ₂ + NADH + H ⁺	M
L-Malato + NAD ⁺ \rightleftharpoons oxalacetato + NADH + H ⁺	M e C
Piruvato + CoA + NAD ⁺ \rightleftharpoons acetil-CoA + CO ₂ + NADH + H ⁺	M
Gliceraldeído-3-fosfato + P _i + NAD ⁺ \rightleftharpoons 1,3-bisfosfoglicerato + NADH + H ⁺	C
Lactato + NAD ⁺ \rightleftharpoons piruvato + NADH + H ⁺	C
β -Hidroxiacil-CoA + NAD ⁺ \rightleftharpoons β -cetoacil-CoA + NADH + H ⁺	M
Ligadas ao NADP	
Glicose-6-fosfato + NADP ⁺ \rightleftharpoons 6-fosfogliconato + NADPH + H ⁺	C
L-Malato + NADP ⁺ \rightleftharpoons Piruvato + CO ₂ + NADPH + H ⁺	C
Ligadas ao NAD ou ao NADP	
L-Glutamato + H ₂ O + NAD(P) ⁺ \rightleftharpoons α -cetoglutarato + NH ₄ ⁺ + NAD(P)H	M
Isocitrato + NAD(P) ⁺ \rightleftharpoons α -cetoglutarato + CO ₂ + NAD(P)H + H ⁺	M e C

^aEstas reações e suas enzimas são discutidas nos Capítulos 14 a 18.^bM designa mitocôndria; C, citosol.

carreadores de elétrons solúveis em água, que se associam *reversivelmente* com desidrogenases. O NADH carrega elétrons das reações catabólicas até seu ponto de entrada na cadeia respiratória, o complexo da NADH-desidrogenase descrito a seguir. O NADPH geralmente supre elétrons para reações anabólicas. As células mantêm conjuntos separados de NADPH e NADH, com diferentes potenciais *redox*. Isso é alcançado mantendo-se a razão de [forma reduzida]/[forma oxidada] relativamente alta para NADPH e relativamente baixa para NADH. Nenhum desses nucleotídeos pode atravessar a membrana mitocondrial interna, mas os elétrons que eles carregam podem ser lançados através dela indiretamente, como será visto.

As **flavoproteínas** contêm um nucleotídeo de flavina, FMN ou FAD (ver Figura 13-27), muito fortemente ligado, às vezes de forma covalente. O nucleotídeo de flavina oxidado pode aceitar um elétron (produzindo a forma semiquinona) ou dois elétrons (produzindo FADH₂ ou FMNH₂). A transferência de elétrons ocorre porque a flavoproteína tem um potencial de redução maior do que o composto oxidado. Lembre-se de que o potencial de redução é uma medida quantitativa da tendência relativa de uma determinada espécie química de aceitar elétrons em uma reação de oxidação-redução (p. 520). O potencial de redução padrão de um nucleotídeo de flavina, ao contrário daquele de NAD ou NADP, depende da proteína com a qual está associado. Interações locais com grupos funcionais na proteína distorcem os orbitais de elétrons no anel de flavina, mudando as estabilidades relativas das formas reduzida e oxidada. O potencial de redução padrão relevante é, portanto, aquele da flavoproteína em particular, e não o do FAD ou do FMN isolados. O nucleotídeo de flavina deve ser considerado parte do sítio ativo da flavoproteína, em vez de um reagente ou produto na reação de transferência de elétrons. Como as

flavoproteínas participam de transferências de um ou dois elétrons, elas servem de intermediários entre reações nas quais dois elétrons são doados (como em desidrogenações) e aquelas nas quais um elétron é cedido (como na redução de uma quinona a hidroquinona, descrita a seguir).

Os elétrons passam por uma série de carreadores ligados à membrana

A cadeia respiratória mitocondrial consiste em uma série de carreadores que agem sequencialmente, sendo a maioria deles proteínas integrais com grupos prostéticos capazes de aceitar e doar um ou dois elétrons. Ocorrem três tipos de transferência de elétrons na fosforilação oxidativa: (1) transferência direta de elétrons, como na redução de Fe³⁺ a Fe²⁺, (2) transferência na forma de um átomo de hidrogênio (H⁺ + e⁻) e (3) transferência como um íon hidreto (:H⁻), que tem dois elétrons. O termo **equivalente redutor** é usado para designar um único elétron equivalente transferido em uma reação de oxidação-redução.

Além do NAD e das flavoproteínas, outros três tipos de moléculas carreadoras de elétrons funcionam na cadeia respiratória: uma quinona hidrofóbica (ubiquinona) e dois tipos diferentes de proteínas que contêm ferro (citocromos e proteínas ferro-enxofre). A **ubiquinona** (também chamada de **coenzima Q**, ou simplesmente **Q**) é uma benzoquinona solúvel em lipídeos, com uma longa cadeia lateral isoprenoide (**Figura 19-3**). A ubiquinona pode aceitar um elétron para se tornar o radical semiquinona ([•]QH) ou dois elétrons para formar ubiquinol (QH₂) e, como os transportadores flavoproteínas, pode atuar na junção entre um doador de dois elétrons e um aceptor de um elétron. Como a ubiquinona é pequena e hidrofóbica, ela é livremente difusível dentro da bicamada lipídica da membrana mitocondrial interna e capaz de movimentar equivalentes redutores entre outros

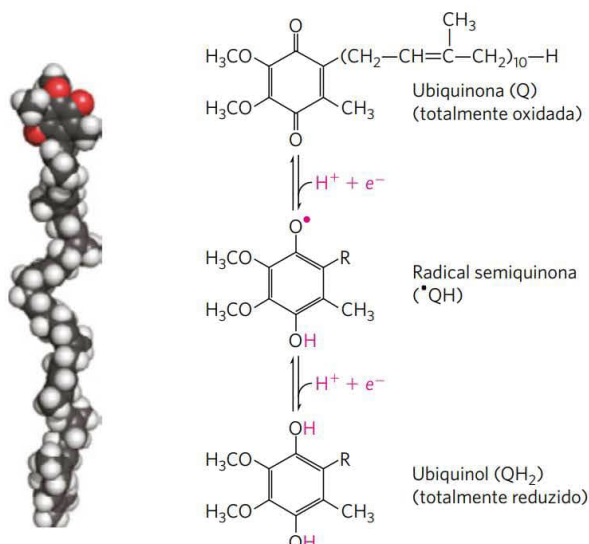


FIGURA 19-3 Ubiquinona (Q ou coenzima Q). A redução completa da ubiquinona requer dois elétrons e dois prótons e ocorre em duas etapas por meio do intermediário, o radical semiquinona.

carreadores de elétrons menos móveis na membrana. Além disso, por carregar elétrons e prótons, ela desempenha um papel central em acoplar o fluxo de elétrons ao movimento de prótons.

Os **citocromos** são proteínas com absorção caracteristicamente forte de luz visível, devida aos seus grupos prostéticos heme contendo ferro (**Figura 19-4a**). As mitocôndrias têm três classes de citocromos, designadas *a*, *b* e *c*, distinguidas por diferenças em seus espectros de absorção de luz. Cada tipo de citocromo em seu estado reduzido (Fe^{2+}) tem três bandas de absorção na faixa visível (Figura 19-4b). A banda de comprimento de onda mais longa é próxima de 600 nm em citocromos tipo *a*, próxima de 560 nm no tipo *b* e perto de 550 nm no tipo *c*. Para distinguir citocromos intimamente relacionados dentro de um determinado tipo, a absorção máxima exata algumas vezes é utilizada nos nomes, como no citocromo b_{562} .

Os hemes dos citocromos *a* e *b* são fortemente, mas não covalentemente, ligados às suas proteínas associadas; os hemes dos citocromos tipo *c* são covalentemente ligados por meio de resíduos de Cys (Figura 19-4). Da mesma maneira que no caso das flavoproteínas, o potencial de redução padrão do átomo de ferro do heme de um citocromo depende

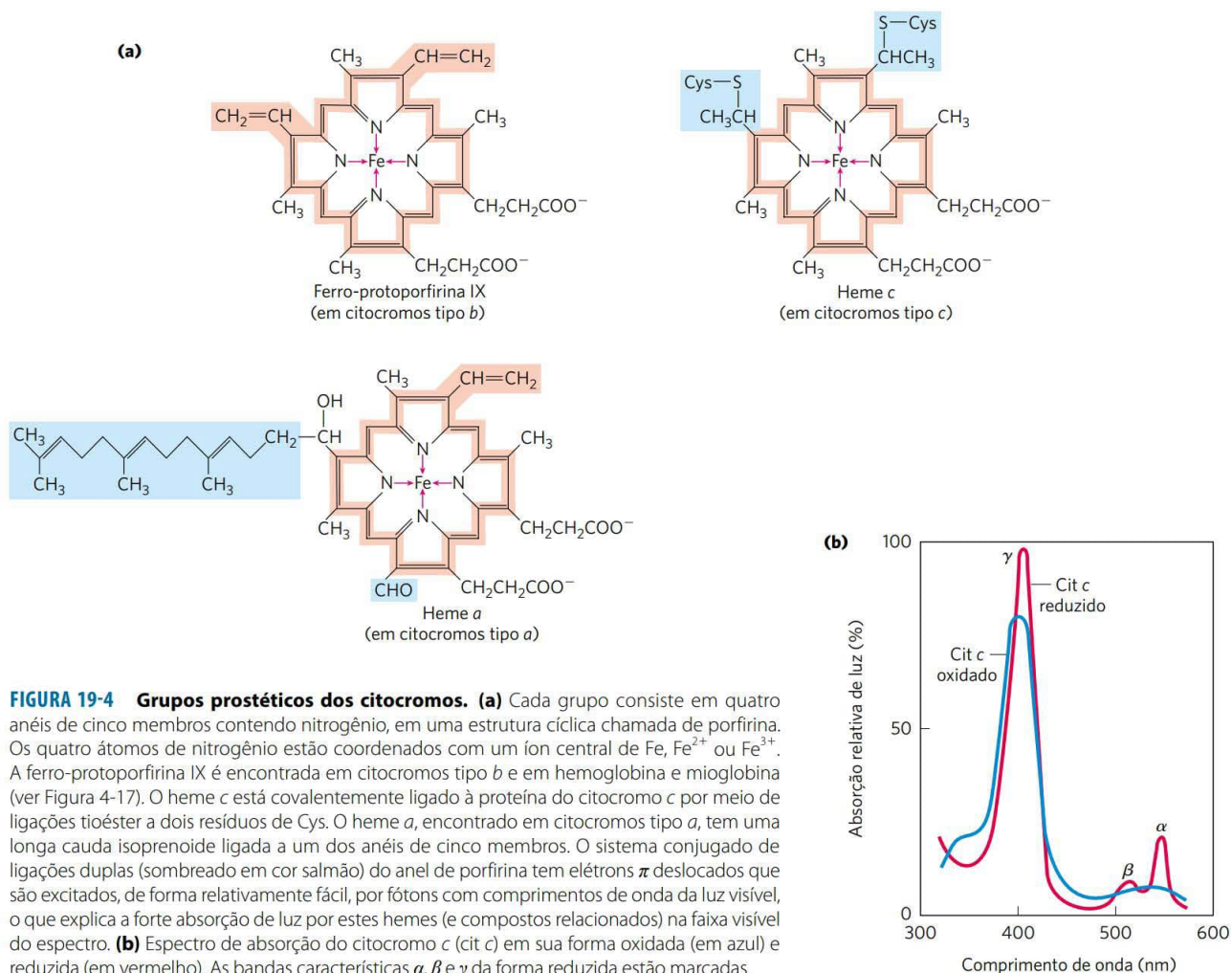


FIGURA 19-4 Grupos prostéticos dos citocromos. (a) Cada grupo consiste em quatro anéis de cinco membros contendo nitrogênio, em uma estrutura cíclica chamada de porfirina. Os quatro átomos de nitrogênio estão coordenados com um íon central de Fe, Fe^{2+} ou Fe^{3+} . A ferro-protoporfirina IX é encontrada em citocromos tipo *b* e em hemoglobina e mioglobina (ver Figura 4-17). O heme *c* está covalentemente ligado à proteína do citocromo *c* por meio de ligações tioéster a dois resíduos de Cys. O heme *a*, encontrado em citocromos tipo *a*, tem uma longa cauda isoprenoide ligada a um dos anéis de cinco membros. O sistema conjugado de ligações duplas (sombreado em cor salmão) do anel de porfirina tem elétrons π deslocados que são excitados, de forma relativamente fácil, por fótons com comprimentos de onda da luz visível, o que explica a forte absorção de luz por estes hemes (e compostos relacionados) na faixa visível do espectro. (b) Espectro de absorção do citocromo *c* (cit *c*) em sua forma oxidada (em azul) e reduzida (em vermelho). As bandas características α , β e γ da forma reduzida estão marcadas.

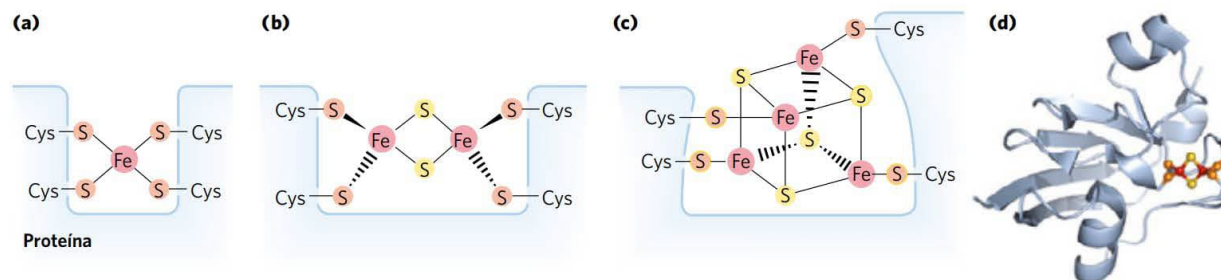


FIGURA 19-5 Centros de ferro-enxofre. Os centros Fe-S das proteínas ferro-enxofre podem ser tão simples como em (a), com um único íon de Fe cercado pelos átomos de S de quatro resíduos de Cys; o Fe é mostrado em vermelho, o S inorgânico em amarelo e o S dos resíduos de Cys em cor de laranja. Outros centros incluem átomos de S tanto inorgânicos quanto fornecidos por Cys, como em (b) centros 2Fe-2S ou em (c) centros 4Fe-4S. (d) A ferredoxina da cianobactéria *Anabaena* 7120 tem um centro 2Fe-2S. (Observe que, nessas designações, apenas os átomos de S inorgânico são contados. Por exemplo, no centro 2Fe-2S (b), cada íon de Fe é na verdade circundado por quatro átomos de S.) O potencial de redução padrão exato do ferro nestes centros depende do tipo de centro e de sua interação com a proteína associada. [Fonte: (d) PDB ID 1FRD, B. L. Jacobson et al., *Biochemistry* 32:6788, 1993.]

de sua interação com as cadeias laterais da proteína, sendo, portanto, diferente para cada citocromo. Os citocromos dos tipos *a* e *b* e alguns do tipo *c* são proteínas integrais da membrana mitocondrial interna. Uma exceção marcante é o citocromo *c* das mitocôndrias, uma proteína solúvel que se associa com a superfície externa da membrana interna por meio de interações eletrostáticas.

Nas **proteínas ferro-enxofre**, o ferro está presente, não no heme, mas sim em associação com átomos de enxofre inorgânico, ou com átomos de enxofre dos resíduos de Cys na proteína, ou com ambos. Esses centros de ferro-enxofre (Fe-S) variam de estruturas simples, com um único átomo de Fe coordenado com quatro grupos Cys—SH, a centros Fe-S mais complexos, com dois ou quatro átomos de Fe (**Figura 19-5**). **Proteínas ferro-enxofre de Rieske** (assim denominadas em homenagem a seu descobridor, John S. Rieske) são uma variação nesse tema, onde um átomo de Fe está combinado com dois resíduos de His, em vez de com dois resíduos de Cys. Todas as proteínas ferro-enxofre participam de transferências de um elétron, nas quais um átomo de ferro do aglomerado ferro-enxofre é oxidado ou reduzido. Pelo menos oito proteínas Fe-S funcio-

nam na transferência mitocondrial de elétrons. O potencial de redução das proteínas Fe-S varia de $-0,65\text{ V}$ a $+0,45\text{ V}$, dependendo do microambiente do ferro dentro da proteína.

Na reação global catalisada pela cadeia respiratória mitocondrial, os elétrons movem-se do NADH, do succinato ou de outro doador primário de elétrons, por flavoproteínas, ubiquinona, proteínas ferro-enxofre e citocromos e, finalmente, chegam ao O_2 . Uma observação dos métodos utilizados para determinar a sequência em que os carreadores agem é informativa, uma vez que as mesmas abordagens gerais foram utilizadas para estudar outras cadeias de transferência de elétrons, como aquelas nos cloroplastos (ver Figura 20-16).

Primeiro, os potenciais de redução padrão dos carreadores de elétrons individuais foram determinados experimentalmente (Tabela 19-2). Poderíamos esperar que os carreadores funcionassem em ordem crescente de potencial de redução, visto que os elétrons tendem a fluir espontaneamente de carregadores de E'^0 menores para carregadores de E'^0 maiores. A ordem dos carregadores deduzida por este método é $\text{NADH} \rightarrow \text{Q} \rightarrow \text{citocromo } b \rightarrow \text{citocromo } c_1 \rightarrow \text{citocromo } c \rightarrow \text{citocromo } a \rightarrow \text{citocromo } a_3 \rightarrow \text{O}_2$.

TABELA 19-2 Potenciais de redução padrão da cadeia respiratória e de carreadores de elétrons relacionados

Reação redox (hemi-reação)	$E'^0\text{ (V)}$
$2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{H}_2$	$-0,414$
$\text{NAD}^+ + \text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{NADH}$	$-0,320$
$\text{NADP}^+ + \text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{NADPH}$	$-0,324$
$\text{NADH-desidrogenase (FMN)} + 2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{NADH-desidrogenase (FMNH}_2\text{)}$	$-0,30$
$\text{Ubiquinona} + 2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{ubiquinol}$	$0,045$
$\text{Citocromo } b\text{ (Fe}^{3+}\text{)} + e^- \longrightarrow \text{citocromo } b\text{ (Fe}^{2+}\text{)}$	$0,077$
$\text{Citocromo } c_1\text{ (Fe}^{3+}\text{)} + e^- \longrightarrow \text{citocromo } c_1\text{ (Fe}^{2+}\text{)}$	$0,22$
$\text{Citocromo } c\text{ (Fe}^{3+}\text{)} + e^- \longrightarrow \text{citocromo } c\text{ (Fe}^{2+}\text{)}$	$0,254$
$\text{Citocromo } a\text{ (Fe}^{3+}\text{)} + e^- \longrightarrow \text{citocromo } a\text{ (Fe}^{2+}\text{)}$	$0,29$
$\text{Citocromo } a_3\text{ (Fe}^{3+}\text{)} + e^- \longrightarrow \text{citocromo } a_3\text{ (Fe}^{2+}\text{)}$	$0,35$
$\frac{1}{2}\text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{H}_2\text{O}$	$0,817$

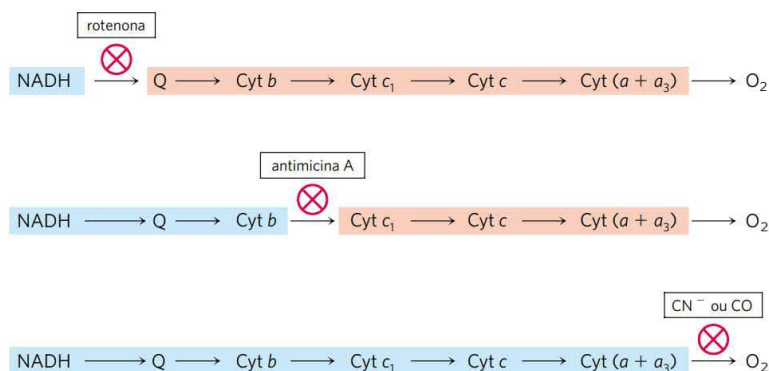


FIGURA 19-6 Método para a determinação da sequência de carreadores de elétrons. Este método mede os efeitos de inibidores da transferência de elétrons no estado de oxidação de cada carreador. Na presença de um doador de elétrons e de O_2 , cada inibidor causa um padrão característico de carreadores oxidados/reduzidos: aqueles antes do bloqueio tornam-se reduzidos (em azul), e aqueles após o bloqueio tornam-se oxidados (em cor salmão).

Observe, no entanto, que a ordem dos potenciais de redução padrão não é necessariamente a mesma que a ordem de potenciais de redução *reais* sob condições celulares, que depende das concentrações das formas reduzidas e oxidadas (ver Equação 13-5, p. 520). Um segundo método para determinar a sequência de carreadores de elétrons envolve reduzir toda a cadeia de carreadores experimentalmente, fornecendo uma fonte de elétrons, mas nenhumceptor de elétrons (sem O_2). Quando o O_2 é repentinamente introduzido no sistema, a taxa com a qual cada carreador de elétrons se torna oxidado (medida espectroscopicamente) revela a ordem em que os carreadores funcionam. O carreador mais próximo do O_2 (no final da cadeia) cede seu elétron primeiro, o segundo carreador contado a partir do final é o próximo a ser oxidado, e assim por diante. Esses experimentos confirmaram a sequência deduzida a partir dos potenciais de redução padrão.

Em uma confirmação final, agentes que inibem o fluxo de elétrons ao longo da cadeia foram usados em combinação com medidas do grau de oxidação de cada carreador. Na presença de O_2 e de um doador de elétrons, os carreadores que funcionam antes da etapa inibida ficam completamente reduzidos, e aqueles que funcionam depois dessa etapa são completamente oxidados (**Figura 19-6**). Usando diversos inibidores que bloqueiam diferentes etapas da cadeia, os investigadores determinaram a sequência inteira, a mesma deduzida nas duas primeiras abordagens.

Os carreadores de elétrons atuam em complexos multienzimáticos

Os carreadores de elétrons da cadeia respiratória são organizados em complexos supramoleculares inseridos dentro da membrana, podendo ser fisicamente separados. Um leve tratamento da membrana mitocondrial interna com detergentes permite a separação de quatro complexos carreadores singulares, cada um capaz de catalisar a transferência de elétrons ao longo de uma porção da cadeia (Tabela 19-3; **Figura 19-7**). Os complexos I e II catalisam a transferência de elétrons para a ubiquinona a partir de dois doadores de elétrons diferentes: NADH (complexo I) e succinato (complexo II). O complexo III carrega elétrons da ubiquinona reduzida para o citocromo *c*, e o complexo IV completa a sequência, transferindo elétrons do citocromo *c* para o O_2 .

Agora, serão estudadas com mais detalhes a estrutura e a função de cada complexo da cadeia respiratória mitocondrial.

Complexo I: NADH a Ubiquina O **complexo I** dos mamíferos, também chamado de **NADH: ubiquinona-oxidoreductase** ou **NADH-desidrogenase**, é uma enzima grande, composta por 45 cadeias diferentes de polipeptídeos, incluindo uma flavoproteína contendo FMN e pelo menos 8 centros de ferro-enxofre. O complexo I tem formato de L, com um braço do L na membrana interna e o outro se estendendo

TABELA 19-3 Os componentes proteicos da cadeia respiratória mitocondrial

Complexo enzimático/proteína	Massa (kDa)	Número de subunidades ^a	Grupo(s) prostético(s)
I NADH-desidrogenase	850	45 (14)	FMN, Fe-S
II Succinato-desidrogenase	140	4	FAD, Fe-S
III Ubiquinona: citocromo <i>c</i> oxidoreductase ^b	250	11	Hemes, Fe-S
Citocromo <i>c</i> ^c	13	1	Heme
IV Citocromo-oxidase ^b	204	13 (3-4)	Hemes; Cu _A , Cu _B

^aNúmero de subunidades nos complexos bacterianos entre parênteses.

^bMassa e dados das subunidades referem-se à forma monomérica.

^cO citocromo *c* não é parte do complexo enzimático; ele move-se entre os complexos III e IV como proteína livremente solúvel.

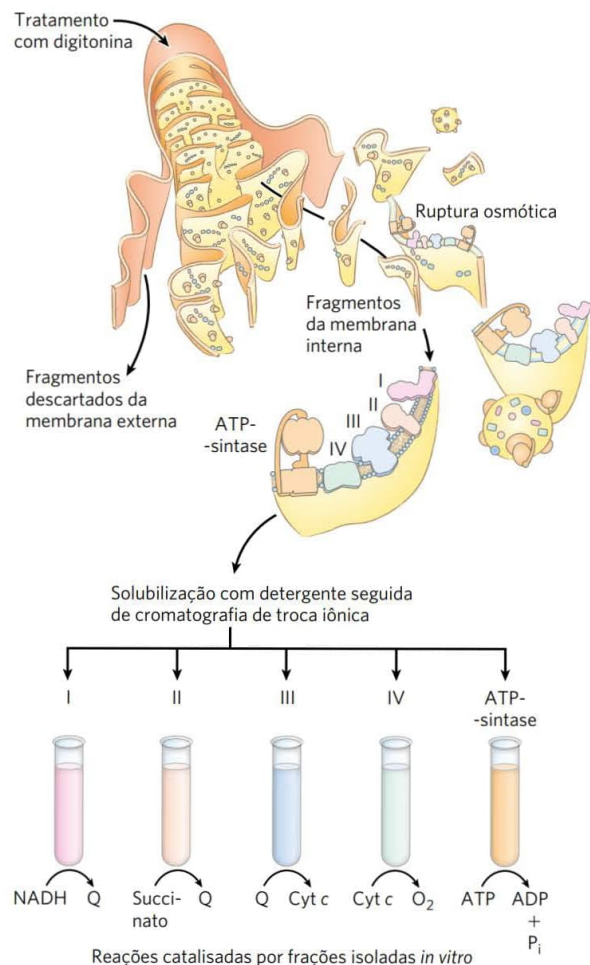


FIGURA 19-7 Separação dos complexos funcionais da cadeia respiratória. Inicialmente, a membrana mitocondrial externa é removida por tratamento com o detergente digitonina. Os fragmentos da membrana interna são, então, obtidos por ruptura osmótica das mitocôndrias, e são dissolvidos suavemente em um segundo detergente. A mistura resultante de proteínas da membrana interna é separada por cromatografia de troca iônica em diferentes complexos (de I a IV) da cadeia respiratória, cada um com sua composição proteica única (ver Tabela 19-3), e a enzima ATP-sintase (algumas vezes chamada de complexo V). Os complexos isolados de I a IV catalisam transferências entre doadores (NADH e succinato), carreadores intermediários (Q e citocromo c) e O_2 , conforme representado. *In vitro*, a ATP-sintase isolada tem apenas atividade de hidrólise de ATP (ATPase), e não de síntese de ATP.

para a matriz. Estudos comparativos do complexo I em bactérias e outros organismos mostram que 7 polipeptídeos no braço da membrana e 7 no braço da matriz são conservados e essenciais (**Figura 19-8**).

O complexo I catalisa dois processos simultâneos e obrigatoriamente acoplados: (1) a transferência exergônica para a ubiquinona de um íon hidreto do NADH e de um próton da matriz, expressa por

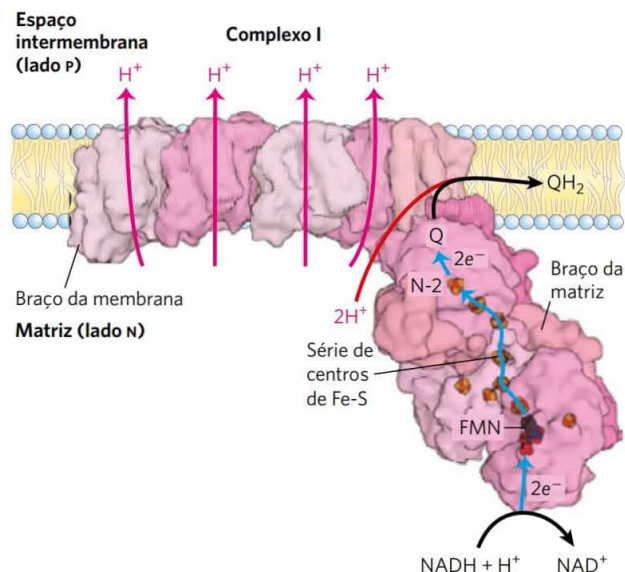


FIGURA 19-8 Estrutura do complexo I (NADH:ubiquinona-oxidorredutase). O complexo I (a estrutura cristalina da bactéria *Thermus thermophilus* é mostrada) catalisa a transferência de um íon hidreto do NADH ao FMN, de onde dois elétrons passam por uma série de centros de Fe-S para o centro Fe-S N-2 no braço da matriz do complexo. A transferência de elétrons de N-2 para a ubiquinona no braço da membrana forma QH_2 , que se difunde na bicamada lipídica. Esta transferência de elétrons também governa a expulsão da matriz de quatro prótons por par de elétrons. O fluxo de prótons produz um potencial eletroquímico através da membrana mitocondrial interna (lado N negativo, lado P positivo). O mecanismo detalhado que acopla a transferência de elétrons e de prótons no complexo I não está bem determinado, porém três das subunidades presentes na membrana são estruturalmente relacionadas a um transportador do tipo antiportador de $\text{Na}^+ - \text{H}^+$, e o caminho pelo qual os prótons se movem pode ser similar em ambos os casos. A quarta via para o movimento dos prótons possivelmente seja através de uma subunidade integral mais próxima ao sítio de ligação de Q. Uma longa hélice (não visível neste esquema) situa-se ao longo da superfície do braço da membrana e pode coordenar a ação de todas as quatro bombas de prótons quando Q é reduzida. [Fonte: PDB ID 4HEA, R. Baradaran et al., *Nature* 494:443, 2013.]

e (2) a transferência endergônica de quatro prótons da matriz para o espaço intermembrana. Os prótons são movidos contra um gradiente de prótons transmembrana nesse processo. O complexo I é, portanto, uma bomba de prótons que utiliza a energia da transferência de elétrons, e a reação que ele catalisa é **vetorial**: ela move prótons em um sentido específico de um local (a matriz, que se torna carregada negativamente com a saída dos prótons) a outro (o espaço intermembrana, que se torna carregado positivamente). Para enfatizar a natureza vetorial do processo, a reação global é frequentemente escrita com subscritos que indicam a localização dos prótons: P para o lado positivo da membrana interna (o espaço intermembrana), N para o lado negativo (a matriz):



TABELA 19-4 Agentes que interferem com a fosforilação oxidativa

Tipo de interferência	Composto ^a	Alvo/modo de ação
Inibição da transferência de elétrons	Cianeto	} Inibem a citocromo-oxidase
	Monóxido de carbono	
	Antimicina A	Bloqueia a transferência de elétrons do citocromo <i>b</i> ao citocromo <i>c</i> ₁
	Mixotiazol	} Impedem a transferência de elétrons do centro Fe-S à ubiquinona
	Rotenona	
	Amital Pieridina A	
Inibição da ATP-sintase	Aurovertina	Inibe F ₁
	Oligomicina Venturicidina	} Inibem F _o
	DCCD	
Desacoplamento entre a fosforilação e a transferência de elétrons	FCCP DNF	} Carreadores hidrofóbicos de prótons
	Valinomicina	
	Proteína desacopladora 1	Em tecido adiposo marrom, forma poros condutores de prótons na membrana mitocondrial interna
Inibição da troca ATP-ADP	Atractilósideo	Inibe a adenina-nucleotídeo-translocase

^aDCCD, diciclo-hexilcarbodiimida; FCCP, cianeto-*p*-trifluorometoxifenil-hidrazona; DNF, 2,4-dinitrofenol.

Amital (fármaco do tipo barbiturato), rotenona (produto vegetal comumente utilizado como inseticida) e pieridina A (antibiótico) inibem o fluxo de elétrons dos centros de ferro-enzofre do complexo I para a ubiquinona (Tabela 19-4) e, portanto, bloqueiam o processo global da fosforilação oxidativa.

Três das sete subunidades proteicas integrais do braço da membrana são semelhantes a um antiportador Na⁺-H⁺ e acredita-se que sejam responsáveis pelo bombeamento de três prótons; uma quarta subunidade no braço da membrana, mais próxima ao sítio de ligação de Q, é provavelmente responsável pelo bombeamento do quarto próton (Figura 19-8).

Como a redução da ubiquinona está acoplada ao bombeamento de prótons? A redução de Q ocorre em local distante do braço da membrana, onde ocorre o bombeamento de prótons, de modo que o acoplamento é claramente indireto. Presume-se que a redução de Q induza uma ampla alteração conformacional no complexo I. A visão em alta resolução do complexo I obtida de estudos cristalográficos sugere um possível mecanismo de acoplamento: uma longa hélice, situada ao longo do braço da membrana, pode transmitir alterações alostéricas ao longo daquele braço. Parece provável que todos os quatro prótons são bombeados simultaneamente, de modo que a energia de uma reação fortemente exergônica (a redução de Q) é dividida em pacotes menores, uma estratégia comum empregada pelos organismos vivos.

Complexo II: succinato a ubiquinona Encontramos o **complexo II** no Capítulo 16 como a **succinato-desidrogenase**, a única enzima ligada à membrana do ciclo do ácido cítrico (p. 632). O complexo II acopla a oxidação do succinato

em um sítio com a redução da ubiquinona em outro sítio, a uma distância de cerca de 40 Å. Embora menor e mais simples do que o complexo I, ele contém cinco grupos prostéticos de dois tipos e quatro subunidades proteicas diferentes (**Figura 19-9**). As subunidades C e D são proteínas integrais de membrana, cada uma com três hélices transmembrana. Elas contêm um grupo heme, heme *b*, e um sítio de ligação para a ubiquinona, oceptor final de elétrons na reação catalisada pelo complexo II. As subunidades A e B estendem-se para a matriz; elas contêm três centros 2Fe-2S, FAD ligado e um sítio de ligação para o substrato, o succinato. Embora a via de transferência global de elétrons seja longa (do sítio de ligação do succinato ao FAD e, então, pelos centros Fe-S rumo ao sítio de ligação de Q), nenhuma das distâncias individuais de transferência de elétrons excede cerca de 11 Å – distância razoável para uma transferência rápida de elétrons (Figura 19-9). A transferência de elétrons no complexo II não é acompanhada por bombeamento de prótons através da membrana interna, embora a QH₂ produzida pela oxidação do succinato seja usada pelo complexo III para impulsionar a transferência de prótons. Uma vez que o complexo II funciona no ciclo do ácido cítrico, fatores que afetem sua atividade (como a disponibilidade de Q oxidada) provavelmente servem para coordenar esse ciclo com a transferência mitocondrial de elétrons.



O heme *b* do complexo II aparentemente não está na via direta de transferência de elétrons; em vez disso, pode servir para reduzir a frequência com que elétrons “vazam” para fora do sistema, movendo-se do succinato ao oxigênio molecular para produzir as **espécies reativas de oxigênio (ERO)** peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o

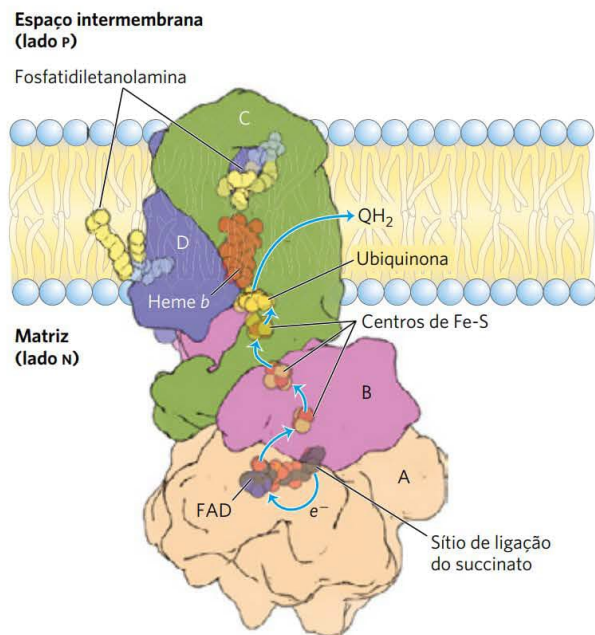


FIGURA 19-9 Estrutura do complexo II (succinato-desidrogenase).

Este complexo (de suíno) tem duas subunidades transmembrana, C e D; as subunidades A e B estendem-se para a matriz. Na subunidade A, logo atrás do FAD, está o sítio de ligação do succinato. A subunidade B tem três centros de Fe-S; a ubiquinona é ligada à subunidade B; um heme *b* está localizado entre as subunidades C e D. Duas moléculas de fosfatidiletanolamina estão tão fortemente ligadas à subunidade D que aparecem na estrutura cristalina. Os elétrons movem-se (setas azuis) do succinato ao FAD e, então, através de três centros de Fe-S, para a ubiquinona. O heme *b* não está na via principal da transferência de elétrons, mas protege contra a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) por elétrons que saem da via. [Fonte: PDB ID 1ZOY, F. Sun et al., *Cell* 121:1043, 2005.]

radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), conforme descrito a seguir. Alguns indivíduos com mutações pontuais em subunidades do complexo II próximas ao heme *b* ou ao sítio de ligação da ubiquinona sofrem de paraganglioma hereditário, que se caracteriza por tumores benignos na cabeça e no pescoço, muitas vezes no corpo carotídeo, um órgão que detecta níveis baixos de O_2 no sangue. Essas mutações resultam em maior produção das ERO e talvez maior dano ao tecido durante a oxidação do succinato. Mutações que afetam a região de ligação do succinato no complexo II podem levar a alterações degenerativas no sistema nervoso central, e algumas mutações estão associadas com tumores da medula suprarrenal. ■

Complexo III: ubiquinona a citocromo *c* Os elétrons da ubiquinona reduzida (ubiquinol, QH_2) passam através de mais dois grandes complexos proteicos na membrana mitocondrial interna antes de alcançarem oceptor final de elétrons, O_2 . O **complexo III**, também chamado de **complexo de citocromo *bc*₁** ou **ubiquinona-citocromo *c*-oxidoreductase**, acopla a transferência de elétrons do ubiquinol (QH_2) para o citocromo *c* com o transporte vetorial de prótons da matriz para o espaço intermembrana. A unidade funcional do complexo III (**Figura 19-10**) é um dímero. Cada monômero consiste em três proteínas fundamentais para a ação do

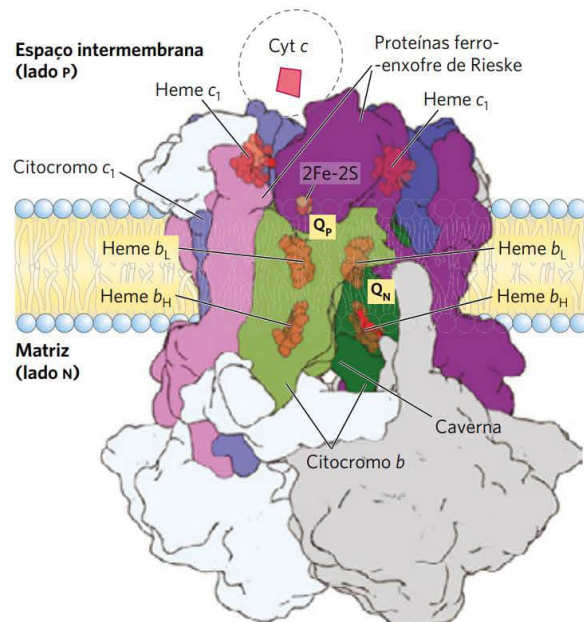


FIGURA 19-10 Estrutura do complexo III (complexo citocromo *bc*₁).

O complexo (de bovino) é um dímero de monômeros idênticos, cada um com 11 subunidades diferentes. O centro funcional de cada monômero é constituído por três subunidades: citocromo *b* (em verde) com seus dois hemes (*b_H* e *b_L*); a proteína ferro-enxofre de Rieske (em púrpura) com seus dois centros de 2Fe-2S; e o citocromo *c*₁ (em azul) com seu heme. Este desenho do complexo mostra como o citocromo *c*₁ e a proteína ferro-enxofre de Rieske projetam-se da superfície *P* e podem interagir com o citocromo *c* (que não faz parte do complexo funcional) no espaço intermembrana. O complexo tem dois sítios de ligação distintos para ubiquinona, *Q_N* e *Q_P*, que correspondem aos sítios de inibição por duas substâncias capazes de bloquear a fosforilação oxidativa. Antimicina A, que bloqueia o fluxo de elétrons do citocromo *b* para o citocromo *c*₁, especificamente do heme *b_H* para *Q_L*, liga-se a *Q_N* perto do heme *b_H* no lado *N* (matriz) da membrana. Mixotiazol, que impede o fluxo de elétrons de QH_2 para a proteína ferro-enxofre de Rieske, liga-se a *Q_P* perto do centro de 2Fe-2S e do heme *b_L* no lado *P*. A estrutura dimérica é essencial para o funcionamento do complexo III. A interface entre os monômeros forma duas cavernas, cada uma contendo um sítio *Q_P* de um monômero e um sítio *Q_N* do outro. Os intermediários da ubiquinona movimentam-se dentro dessas cavernas protegidas.

O complexo III cristaliza em duas conformações distintas (não mostradas). Em uma, o centro de Fe-S de Rieske está próximo ao seuceptor de elétrons, o heme do citocromo *c*₁, mas relativamente distante do citocromo *b* e do sítio de ligação de QH_2 , no qual o centro de Fe-S de Rieske recebe elétrons. Na outra, o centro de Fe-S se afastou do citocromo *c*₁ e se aproximou do citocromo *b*. Acredita-se que a proteína de Rieske oscile entre essas duas conformações, à medida que é primeiramente reduzida e depois oxidada. [Fonte: PDB ID 1BGY, S. Iwata et al., *Science* 281:64, 1998.]

complexo: citocromo *b*, citocromo *c*₁ e proteína ferro-enxofre de Rieske. (Várias outras proteínas associadas ao complexo III em vertebrados não são conservadas ao longo do filo e, presumivelmente, desempenham um papel auxiliar.) Os dois monômeros de citocromo *b* cercam uma “caverna” no meio da membrana, na qual a ubiquinona está livre para se mover do lado da matriz da membrana (sítio *Q_N* em um monômero) para o espaço intermembrana (sítio *Q_P* no outro monômero) na medida em que ela lança elétrons e prótons através da membrana mitocondrial interna.

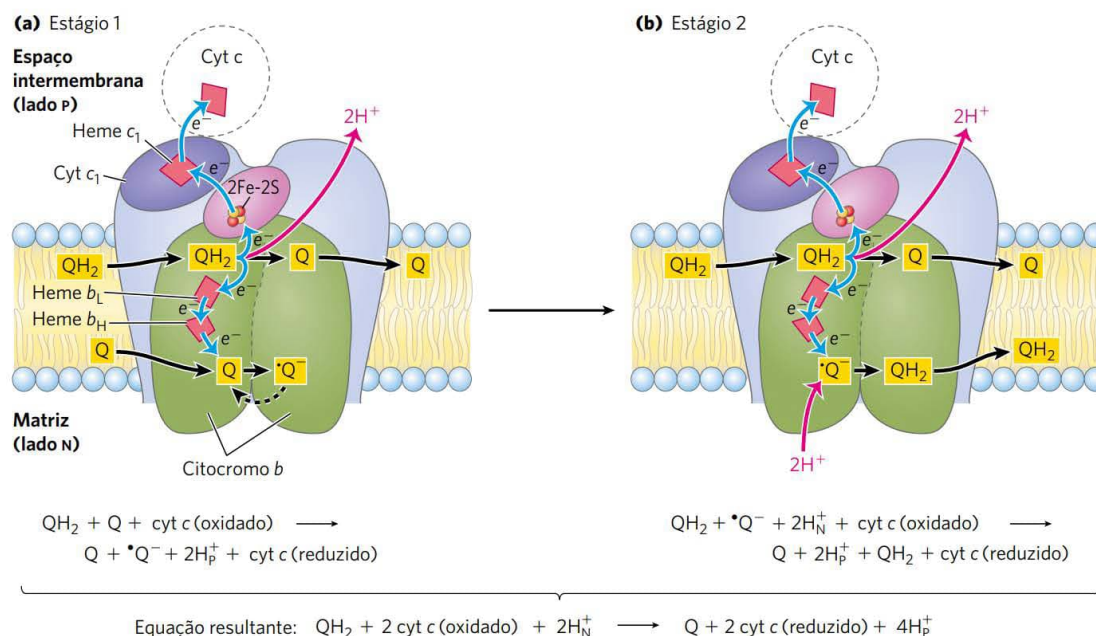
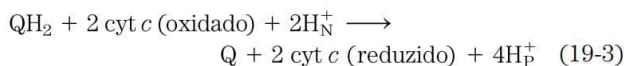


FIGURA 19-11 O ciclo Q apresentado em dois estágios. O percurso dos elétrons através do complexo III é mostrado com setas azuis; o movimento das várias formas da ubiquinona, com setas escuras. **(a)** No primeiro estágio, Q no lado N é reduzida ao radical semiquinona, que retorna à sua posição para aceitar outro elétron. **(b)** No segundo estágio, o radical semiquinona é convertido a QH_2 . Enquanto isto, no lado P da membrana, duas moléculas de QH_2 são oxidadas a Q, liberando dois prótons por molécula de Q (quatro prótons ao todo) para o espaço intermembrana. Cada QH_2 doa um elétron (por meio do centro de Fe-S de Rieske) para o citocromo c_1 e um elétron (via citocromo b) para a molécula de Q próxima ao lado N, reduzindo-a em duas etapas a QH_2 . Essa redução também consome dois prótons por molécula de Q, os quais são retirados da matriz (lado N). O citocromo c_1 reduzido passa elétrons, um por vez, ao citocromo c, que se dissocia e carrega elétrons ao complexo IV. Em cada ciclo, uma redução de Q no sítio Q_N está acoplada a duas oxidações de QH_2 no sítio Q_P pelo consumo de dois prótons da matriz e liberação de quatro prótons no espaço intermembrana.

Para explicar o papel de Q na conservação de energia, Mitchell propôs o “**ciclo Q**” (Figura 19-11). À medida que os elétrons se movem de QH_2 pelo complexo III, QH_2 é oxidada com a liberação de prótons em um lado da membrana (em Q_P), ao passo que, no outro sítio (Q_N), Q é reduzida e prótons são capturados. O produto de um sítio catalítico, assim, torna-se o substrato no segundo sítio, e vice-versa. A equação líquida para as reações *redox* do ciclo Q é



O ciclo Q acomoda a troca entre o carreador de dois elétrons ubiquinol (a forma reduzida da ubiquinona) e os carreadores de um elétron – hemes b_L e b_H do citocromo b e dos citocromos c_1 e c – e resulta na captação de dois prótons no lado N e a liberação de quatro prótons no lado P por par de elétrons que passa do complexo III para o citocromo c. Dois dos prótons liberados no lado P são eletrogênicos; os outros dois são eletroneutros, pois são equilibrados pelas duas cargas (elétrons) passadas ao citocromo c no lado P. Embora o percurso dos elétrons por esse segmento da cadeia respiratória seja complicado, o efeito resultante da transferência é simples: QH_2 é oxidado a Q, duas moléculas de citocromo c são reduzidas, e dois prótons são movidos do lado P para o lado N da membrana mitocondrial interna.

O citocromo c é uma proteína solúvel do espaço intermembrana, que se associa reversivelmente com o lado P da membrana interna. Depois que seu único heme aceita um

elétron do complexo III, o citocromo c move-se no espaço intermembrana para o complexo IV para doar o elétron para um centro de cobre binuclear.

Complexo IV: citocromo c para o O_2 Na etapa final da cadeia respiratória, o **complexo IV**, também chamado de **citocromo-oxidase**, carrega elétrons do citocromo c para o oxigênio molecular, reduzindo-o a H_2O . O complexo IV é uma enzima dimérica grande da membrana mitocondrial interna, cada monômero apresentando 13 subunidades e M_r de 204.000. As bactérias contêm uma forma bem mais simples, com apenas três ou quatro subunidades por monômero, mas ainda capaz de catalisar tanto a transferência de elétrons quanto o bombeamento de prótons. A comparação dos complexos mitocondriais e bacterianos sugere que essas três subunidades foram conservadas na evolução; em organismos multicelulares, as demais 10 subunidades podem contribuir para a união ou para a estabilidade do complexo IV (Figura 19-12).

A subunidade II do complexo IV contém dois íons cobre complexados com os grupos $-SH$ de dois resíduos de Cys em um centro binuclear (Cu_A ; Figura 19-12b) que lembra os centros de 2Fe-2S das proteínas ferro-enxofre. A subunidade I contém dois grupos heme, designados a e a_3 , e um outro íon cobre (Cu_B). Heme a_3 e Cu_B formam um segundo centro binuclear que aceita elétrons de heme a e os transfere ao O_2 ligado ao heme a_3 . O papel detalhado da subunidade III não foi esclarecido, mas sua presença é essencial para a função do complexo IV.

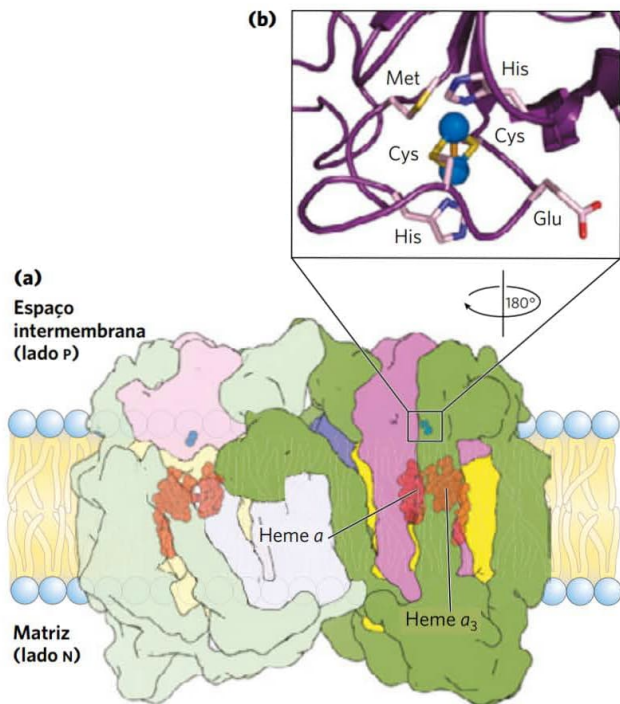


FIGURA 19-12 Estrutura do complexo IV (citocromo-oxidase). (a) Este complexo (de bovino) tem 13 subunidades em cada monômero idêntico de sua estrutura dimérica. A subunidade I (em amarelo) tem dois grupos heme, *a* e *a*₃, próximas a um único íon cobre, Cu_B (não visível aqui). Heme *a*₃ e Cu_B formam um centro binuclear Fe-Cu. A subunidade II (em púrpura) contém dois íons Cu complexados com os grupos —SH de dois resíduos de Cys em um centro binuclear, Cu_A, que lembra os centros de 2Fe-2S das proteínas ferro-enxofre. O centro binuclear e o sítio de ligação ao citocromo *c* estão localizados em um domínio da subunidade II que se projeta do lado P da membrana interna (para o espaço intermembrana). A subunidade III (em azul-claro) é essencial para o rápido movimento de prótons pela subunidade II. Os papéis das demais 10 subunidades no complexo IV (em verde) de mamíferos não estão completamente esclarecidos, mas alguns atuam na organização ou na estabilização do complexo. (b) Centro binuclear de Cu_A. Os íons Cu (esferas azuis) partilham elétrons igualmente. Quando o centro está reduzido, os íons têm as cargas formais Cu¹⁺Cu¹⁺; quando oxidado, Cu^{1.5+}Cu^{1.5+}. Seis resíduos de aminoácidos são ligantes ao redor dos íons Cu: Glu, Met, dois His e dois Cys. [Fonte: PDB ID 1OCC, T. Tsukihara et al., *Science* 272:1136, 1996.]

A transferência de elétrons pelo complexo IV dá-se do citocromo *c* para o centro de Cu_A, para o heme *a*, para o centro de heme *a*₃-Cu_B e, finalmente, para o O₂ (**Figura 19-13**). Para cada dois elétrons que passam pelo complexo, a enzima consome dois H⁺ “substratos” da matriz (lado N) na conversão de ½O₂ a H₂O. Ela também usa a energia dessa reação *redox* para bombear dois prótons para fora em direção ao espaço intermembrana (lado P) para cada par de elétrons que passa, contribuindo para o potencial eletroquímico produzido pelo transporte de prótons possibilitado pela energia dessas reações *redox* pelos complexos I e III. A reação geral catalisada pelo complexo IV é

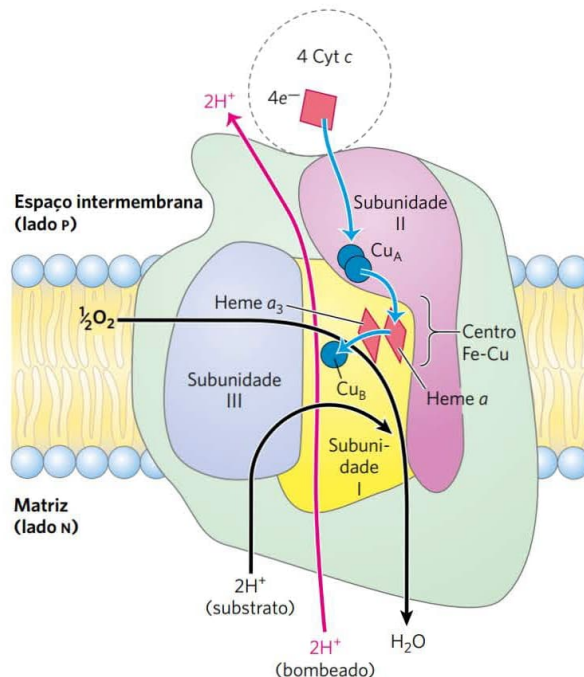
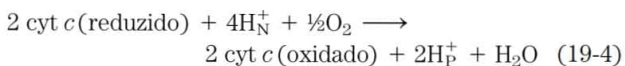


FIGURA 19-13 Via dos elétrons pelo complexo IV. Para simplificar, apenas um monômero do complexo IV dimérico bovino é mostrado nesta figura. As três proteínas cruciais para o fluxo de elétrons são as subunidades I, II e III. A estrutura maior em verde inclui outras 10 proteínas em cada monômero do complexo dimérico. A transferência de elétrons pelo complexo IV inicia com o citocromo *c* (parte superior). Duas moléculas de citocromo *c* reduzido doam, cada uma, um elétron para o centro binuclear Cu_A. Deste, os elétrons passam pelo heme *a* para o centro de Fe-Cu (heme *a*₃ e Cu_B). O oxigênio agora se liga ao heme *a*₃ e é reduzido a seu derivado peróxido (O₂²⁻, não mostrado aqui) por dois elétrons do centro de Fe-Cu. A chegada de mais dois elétrons a partir do citocromo *c* (parte superior, perfazendo quatro elétrons ao todo) converte o O₂²⁻ em duas moléculas de água, com o consumo de quatro prótons (“substrato”) da matriz. Ao mesmo tempo, dois prótons são bombeados da matriz para cada par de elétrons que passa pelo complexo IV, por meio de um mecanismo ainda não bem esclarecido. Observe que a redução do O₂ a 2H₂O requer quatro elétrons, ou dois pares de elétrons.

Esta redução com dois elétrons de ½O₂ requer a oxidação de QH₂, que, por sua vez, requer a oxidação de NADH ou de succinato.

No complexo IV, o O₂ é reduzido em centros *redox* que transportam apenas um elétron por vez. Normalmente, os intermediários de oxigênio não completamente reduzidos permanecem fortemente ligados ao complexo, até serem completamente convertidos em água, porém uma pequena fração de intermediários de oxigênio escapa. Esses intermediários são espécies reativas de oxigênio que podem danificar componentes celulares, a menos que sejam eliminados por mecanismos de defesa, descritos abaixo.

Complexos mitocondriais associam-se, formando respirassomos

Embora os quatro complexos transportadores de elétrons possam ser separados em laboratório, na mitocôndria intacta os complexos respiratórios se associam firmemente uns com

os outros na membrana interna para formar **respirassomos**, combinações funcionais de dois ou mais complexos de transferência de elétrons diferentes. Por exemplo, quando o complexo III é extraído gentilmente das membranas mitocondriais, verifica-se que ele está associado com o complexo I e permanece associado durante eletroforese em condições moderadas. Agregados purificados dos complexos III e IV também podem ser isolados e, quando vistos por criomicroscopia eletrônica de partícula única, uma ferramenta poderosa de análise (Quadro 19-1), eles aparecem como supercomplexos regulares, com o tamanho e a forma certos para acomodar as estruturas cristalinas de ambos os complexos (Figura 19-14). A cinética do fluxo de elétrons pela série de complexos respiratórios seria muito diferente nos dois casos extremos de firme associação *versus* não associação entre os complexos: (1) se os complexos fossem firmemente associados, as transferências de elétrons ocorreriam essencialmente através de um estado sólido; e (2) se os complexos funcionassem separadamente, os elétrons seriam carregados entre eles pela ubiquinona e pelo citocromo *c*. A evidência cinética sustenta a transferência de elétrons através de um estado sólido e, portanto, o modelo do respirassomo.

A cardiolipina, o lipídeo especialmente abundante na membrana mitocondrial interna (ver Figuras 10-8 e 11-2), pode ser essencial para a integridade dos respirassomos; sua remoção com detergentes ou sua ausência em certos mutan-

tes de leveduras resulta em transferência de elétrons anormal na mitocôndria e em uma perda de afinidade entre os complexos respiratórios. Algumas das proteínas “auxiliares” dos complexos, sem papel aparente na transferência de elétrons, talvez sirvam para manter os respirassomos unidos.

Outras vias doam elétrons para a cadeia respiratória via ubiquinona

Várias outras reações de transferência de elétrons podem reduzir a ubiquinona na membrana mitocondrial interna (Figura 19-15). O primeiro passo na β -oxidação da acil-CoA dos ácidos graxos, catalisada pela flavoproteína **acil-CoA-desidrogenase** (ver Figura 17-8), envolve a transferência de elétrons do substrato para o FAD da desidrogenase e, então, para a flavoproteína transferidora de elétrons (FTE). A FTE, por sua vez, passa seus elétrons à **FTE:ubiquinona-oxidoreductase**, que reduz Q, na membrana mitocondrial interna, a QH_2 . O glicerol-3-fosfato, formado a partir do glicerol liberado pela quebra de triacilgliceróis ou pela redução da di-hidroxiacetona-fosfato da glicólise, é oxidado pela **glicerol-3-fosfato-desidrogenase** (ver Figura 17-4), uma flavoproteína localizada na face externa da membrana mitocondrial interna. O aceptor de elétrons nesta reação é a Q; a QH_2 produzida entra no conjunto de QH_2 na membrana. O importante papel da glicerol-3-fosfato-desidrogenase em lançar equivalentes

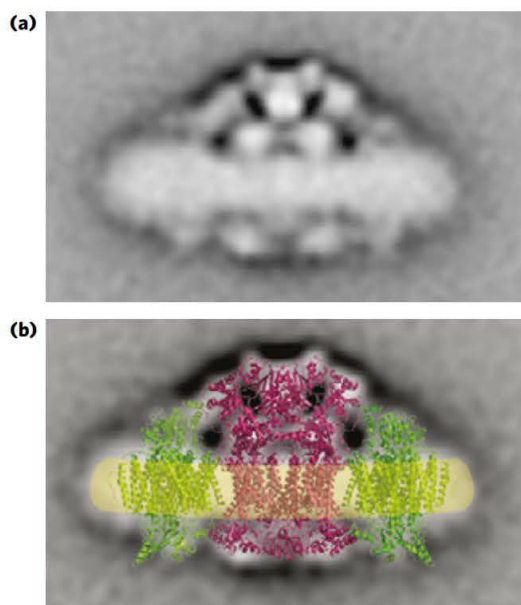


FIGURA 19-14 Um respirassomo composto pelos complexos III e IV. (a) Supercomplexos purificados contendo complexos III e IV de levedura, visualizados por microscopia eletrônica depois de rápido congelamento. As densidades eletrônicas de centenas de imagens foram utilizadas para compor esta visualização média (ver Quadro 19-1). (b) As estruturas por raios X de uma molécula do complexo III (em vermelho; de leveduras) e de duas do complexo IV (em verde; de coração bovino) puderam ser ajustadas ao mapa de densidade eletrônica para sugerir um possível modo de interação destes complexos em um respirassomo. Esta visualização está no plano da bicamada (em amarelo). [Fonte: cortesia de Egbert Boekema.]

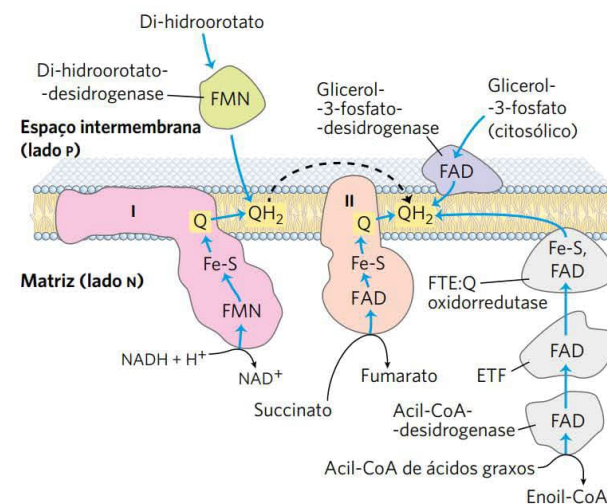


FIGURA 19-15 Vias para a transferência de elétrons para a ubiquinona na cadeia respiratória. Elétrons do NADH na matriz passam através do FMN em uma flavoproteína (NADH-desidrogenase) para uma série de centros de Fe-S (no complexo I) e então para Q. Os elétrons da oxidação do succinato no ciclo do ácido cítrico passam via uma flavoproteína com vários centros Fe-S (complexo II) em seu percurso para Q. A acil-CoA-desidrogenase, a primeira enzima da β -oxidação dos ácidos graxos, transfere elétrons para a flavoproteína transferidora de elétrons (FTE), da qual eles são transferidos para Q via FTE:ubiquinona-oxidoreductase. O di-hidroorotato, um intermediário na via biossintética de nucleotídeos pirimídicos (ver Figura 22-38), doa dois elétrons para Q via uma flavoproteína (di-hidroorotato-desidrogenase). Por sua vez, o glicerol 3-fosfato, um intermediário da glicólise no citosol, doa elétrons para uma flavoproteína (glicerol-3-fosfato-desidrogenase) na face externa da membrana mitocondrial interna, da qual os elétrons passam para a Q.

QUADRO 19-1

MÉTODOS

Determinando estruturas tridimensionais de grandes complexos macromoleculares por criomicroscopia eletrônica de partícula única

Nossa compreensão de um processo altamente complexo, como é a fosforilação oxidativa mitocondrial, é auxiliada imensamente pelo conhecimento das estruturas moleculares detalhadas das proteínas que participam do processo. Contudo, muitas vezes é difícil determinar a estrutura molecular de grandes complexos macromoleculares, como os complexos da cadeia respiratória ou a ATP-sintase. As proteínas integrais de membrana frequentemente resistem à cristalização uma vez removidas de seu ambiente lipídico, de modo que suas estruturas não podem ser determinadas por difração de raios X. Em princípio, objetos pequenos, na faixa dos 100 a 300 Å de diâmetro, podem ser visualizados por microscopia eletrônica (ME). Na prática, a alta intensidade do feixe na ME frequentemente danifica a amostra antes que uma imagem de alta resolução possa ser obtida. Na **criomicroscopia eletrônica**, uma amostra contendo muitas cópias individuais da estrutura de interesse é congelada rapidamente e é mantida congelada enquanto é observada em duas dimensões com o microscópio eletrônico, reduzindo enormemente o dano infligido à amostra pelo feixe eletrônico. O desenvolvimento de um detector eletrônico direto, com maior sensibilidade e menor ruído, foi também um aprimoramento-chave, permitindo exposições mais curtas da amostra ao feixe de elétrons.

Partículas como os complexos mitocondriais purificados, organizados ao acaso na grade do microscópio, são visualizadas com o microscópio crioelétrônico. Quando a crio-ME é combinada com algoritmos poderosos para transformar estruturas bidimensionais de dezenas de milhares de complexos individuais orientados ao acaso em uma composição tridimensional, às vezes é possível determinar estruturas moleculares em um nível comparável ao obtido por cristalografia por raios X (Figura Q-1). Em

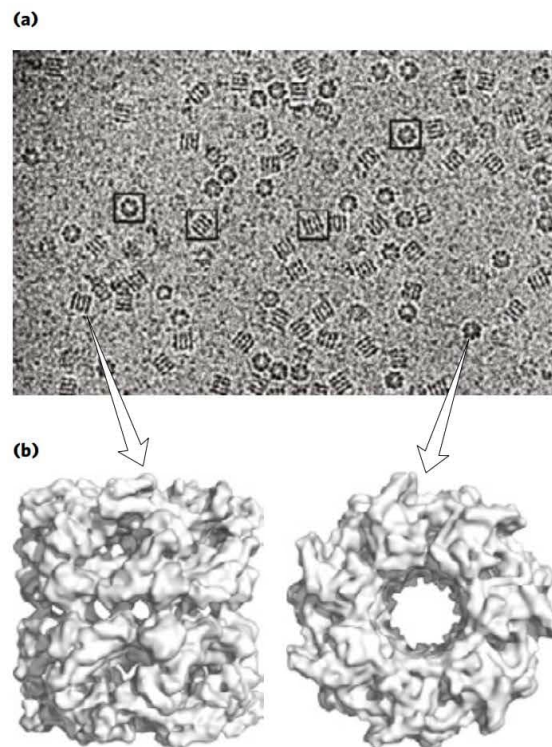
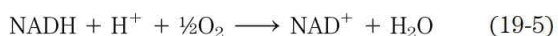


FIGURA Q-1 Estrutura da proteína chaperona GroEL determinada por crio-ME de partícula única. **(a)** Imagens por ME de muitas partículas individuais de GroEL. **(b)** Vistas lateral e superior da estrutura tridimensional obtida da análise de imagens de ME. [Fontes: (a) © Alberto Bartesaghi, PhD. (b) PDB ID 3E76, P. D. Kaiser et al., *Acta Crystallogr.* 65:967, 2009.]

redutores do NADH citosólico para a matriz mitocondrial é descrito na Seção 19.2 (ver Figura 19-32). A **di-hidroorotato-desidrogenase**, que atua na síntese de pirimidinas (ver Figura 22-38), também está localizada na porção externa da membrana mitocondrial interna e doa elétrons à Q na cadeia respiratória. QH₂ reduzida passa seus elétrons para o complexo III, e eles chegam, por fim, ao O₂.

A energia da transferência de elétrons é conservada de maneira eficaz em um gradiente de prótons

A transferência de dois elétrons do NADH, por meio da cadeia respiratória, para o oxigênio molecular pode ser escrita como



Esta reação resultante é altamente exergônica. Para o par *redox* NAD⁺/NADH, E'° é -0,320 V, e, para o par O₂/H₂O, E'° é +0,816 V. O $\Delta E'^{\circ}$ para esta reação é, portanto,

1,14 V, e a variação na energia livre padrão (ver Equação 13-7, p. 521) é

$$\begin{aligned} \Delta G'^{\circ} &= -nF \Delta E'^{\circ} & (19-6) \\ &= -2(96,5 \text{ kJ/V} \cdot \text{mol})(1,14 \text{ V}) \\ &= -220 \text{ kJ/mol (de NADH)} \end{aligned}$$

Esta variação na energia livre *padrão* tem como base a pressuposição de concentrações iguais (1 M) de NADH e de NAD⁺. Em mitocôndrias que respiram ativamente, as ações de muitas desidrogenases mantêm a razão [NADH]/[NAD⁺] real bem acima da unidade, e a variação real da energia livre para a reação mostrada na Equação 19-5 é, portanto, substancialmente maior (mais negativa) do que -220 kJ/mol. Um cálculo semelhante para a oxidação do succinato mostra que a transferência de elétrons do succinato (E'° para fumarato/succinato = 0,031 V) para o O₂ tem uma variação na energia livre padrão menor, mas ainda negativa, de cerca de -150 kJ/mol.

casos favoráveis, os aspectos repetitivos podem ser automatizados, como a escolha de objetos a serem incluídos na análise, o imageamento de cada objeto individualmente e os cálculos para produzir uma estrutura tridimensional a partir do imenso número de imagens bidimensionais. Se as estruturas de componentes proteicos individuais de um grande complexo são conhecidas a par-

tir de cristalografia por raios X (ver Figura 19-25), modelos atômicos podem ser ajustados no complexo delineado para confirmar a estrutura obtida por crio-ME (Figura 2). O banco de dados EMDataBank (emdatbank.org) é um recurso unificado para estudar mapas de estruturas obtidas por ME, depositados em bancos de dados aos quais são atribuídos códigos de acesso EMD.

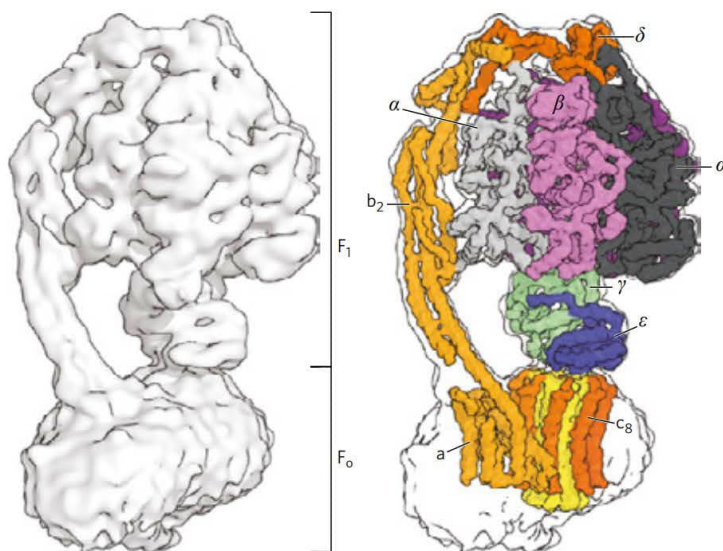
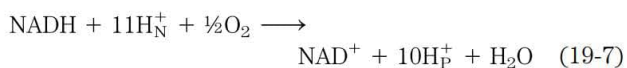


FIGURA Q-2 (a) Estrutura tridimensional de ATP-sintase bovina, obtida por crio-ME de partícula única. Este método revelou mais da estrutura das subunidades a e b na porção do complexo embebida na membrana do que estava disponível a partir de cristalografia por raios X. A estrutura na parte inferior à esquerda inclui a subunidade a e uma extensão da subunidade b, assim como diversas outras proteínas pequenas associadas à estrutura de F₀, mas não visíveis em estruturas cristalográficas. (b) Um modelo atômico consistente com estruturas obtidas por cristalografia por raios X pode ser ajustado aos contornos derivados da crio-ME, produzindo uma figura bastante aprimorada da estrutura global da ATP-sintase. [Fontes: (a) EMD-3164 e (b) PDB ID 5ARA, A. Zhou et al., *eLife* 4:e10180, 2015.]

A maior parte dessa energia é usada para bombear prótons para fora da matriz. Para cada par de elétrons transferido para o O₂, quatro prótons são bombeados para fora pelo complexo I, quatro pelo complexo III e dois pelo complexo IV (**Figura 19-16**). A equação *vetorial* para o processo é, portanto,



A energia eletroquímica inerente a essa diferença na concentração de prótons e à separação de cargas representa uma conservação temporária de grande parte da energia da transferência de elétrons. A energia estocada nesse gradiente, chamada de **força próton-motriz**, tem dois componentes: (1) a *energia potencial química*, devida à diferença de concentração de uma espécie química (H⁺) nas duas regiões separadas pela membrana; e (2) a *energia potencial elétrica*, que resulta da separação de cargas quando

um próton se move através da membrana sem um contra-íon (**Figura 19-17**).

Conforme mostrado no Capítulo 11, a variação de energia livre para a criação de um gradiente eletroquímico por uma bomba de íons é

$$\Delta G = RT \ln(C_2/C_1) + ZF \Delta\psi \quad (19-8)$$

em que C₂ e C₁ são as concentrações de um íon nas duas regiões, e C₂ > C₁; Z é o valor absoluto de sua carga elétrica (1 para um próton); e Δψ é a diferença transmembrana no potencial elétrico, medida em volts.

Para os prótons,

$$\begin{aligned} \ln(C_2/C_1) &= 2,3(\log[\text{H}^+]_{\text{P}} - \log[\text{H}^+]_{\text{N}}) \\ &= 2,3(\text{pH}_{\text{N}} - \text{pH}_{\text{P}}) = 2,3 \Delta\text{pH} \end{aligned}$$

e a Equação 19-8 se reduz a

$$\Delta G = 2,3RT \Delta\text{pH} + F\Delta\psi \quad (19-9)$$

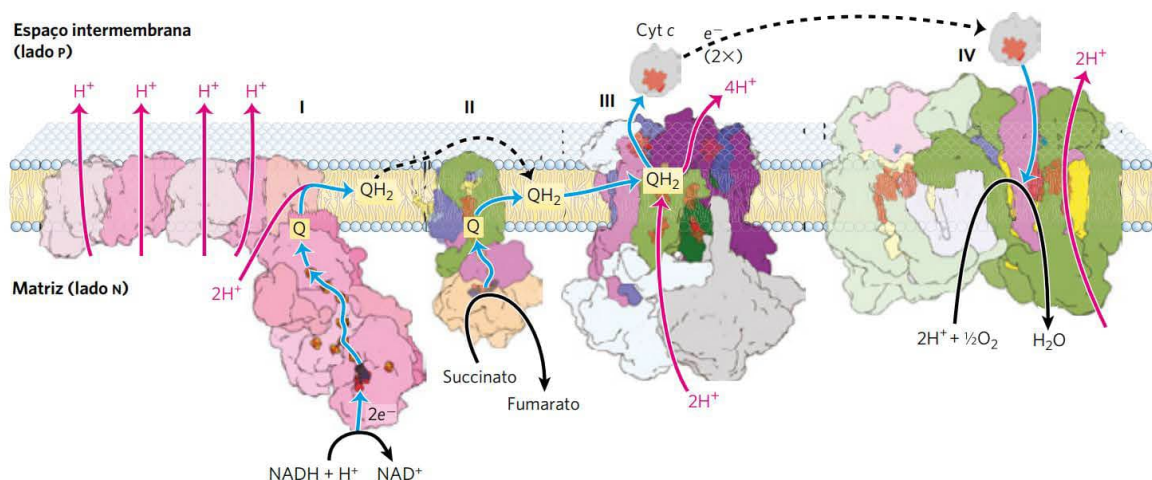


FIGURA 19-16 Resumo do fluxo de elétrons e prótons pelos quatro complexos da cadeia respiratória. Os elétrons chegam à Q pelos complexos I e II (assim como por meio de várias outras reações, mostradas na Figura 19-15). A Q reduzida (QH_2) serve como um carreador móvel de elétrons e prótons. Ela entrega elétrons ao complexo III, que, por sua vez, os passa a outro elo móvel que conecta os complexos, o citocromo c. O complexo IV transfere, então, os elétrons do citocromo c reduzido para o O_2 . O fluxo de elétrons pelos complexos I, III e IV é acompanhado por efluxo de prótons da matriz para o espaço intermembrana. No coração bovino, as razões aproximadas dos complexos I:II:III:IV são 1,1:1,3:3,0:6,7. As linhas tracejadas indicam a difusão de Q no plano da membrana interna e do citocromo c pelo espaço intermembrana. [Fontes: complexo I: PDB ID 4HEA, R. Baradaran et al., *Nature* 494:443, 2013. Complexo II: PDB ID 1ZOY, F. Sun et al., *Cell* 121:1043, 2005. Complexo III: PDB ID 1BGY, S. Iwata et al., *Science* 281:64, 1998. Citocromo c: PDB ID 1HRC, G. W. Bushnell et al., *J. Mol. Biol.* 214:585, 1990. Complexo IV: PDB ID 1OCC, T. Tsukihara et al., *Science* 272:1136, 1996.]

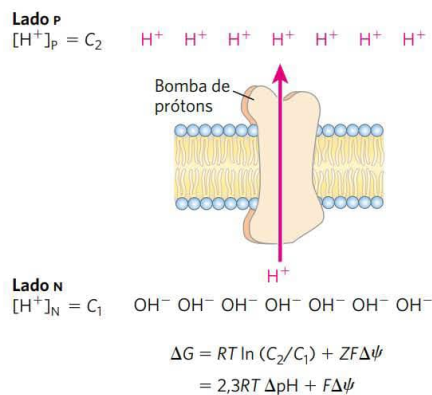


FIGURA 19-17 Força próton-motriz. A membrana mitocondrial interna separa dois compartimentos de diferentes $[\text{H}^+]$, resultando em diferenças na concentração química (ΔpH) e na distribuição de cargas ($\Delta\psi$) através da membrana. O efeito resultante é a força próton-motriz (ΔG), que pode ser calculada como aqui apresentado. Isso é explicado de forma mais completa no texto.

Em mitocôndrias que respiram ativamente, o $\Delta\psi$ medido é de 0,15 a 0,20 V, e o pH da matriz é cerca de 0,75 unidade mais alcalino do que aquele do espaço intermembrana.

PROBLEMA19-1 Energética da transferência de elétrons

Calcule a quantidade de energia conservada no gradiente de prótons através da membrana mitocondrial interna por

par de elétrons transferido através da cadeia respiratória do NADH ao oxigênio. Assuma que $\Delta\psi$ é de 0,15 V e a diferença de pH é de 0,75 unidade a uma temperatura corporal de 37°C.

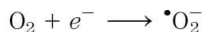
Solução: a Equação 19-9 fornece a mudança de energia livre quando *um* mol de prótons se move através da membrana interna. Substituindo-se os valores das constantes R e F , 310 K para T , e os valores medidos para ΔpH (0,75 unidade) e $\Delta\psi$ (0,15 V) nesta equação, temos $\Delta G = 19 \text{ kJ/mol}$ (de prótons). Como a transferência de dois elétrons do NADH ao O_2 é acompanhada pelo bombeamento para fora de 10 prótons (Equação 19-7), aproximadamente 190 kJ (dos 220 kJ liberados pela oxidação de 1 mol de NADH) são conservados no gradiente de prótons.

Quando os prótons fluem espontaneamente *a favor* de seu gradiente eletroquímico, energia faz-se disponível para realizar trabalho. Em mitocôndrias, cloroplastos e bactérias aeróbicas, a energia eletroquímica do gradiente de prótons impulsiona a síntese de ATP a partir de ADP e P_i . Mais detalhes sobre energética e estequiometria da síntese de ATP propiciada pelo potencial eletroquímico do gradiente de prótons podem ser encontrados na Seção 19.2.

Espécies reativas de oxigênio são geradas durante a fosforilação oxidativa

Diversas etapas na via de redução do oxigênio em mitocôndrias têm o potencial de produzir radicais livres altamen-

te reativos que podem danificar as células. A passagem de elétrons de QH_2 ao complexo III e a passagem de elétrons dos complexos I e II ao QH_2 envolvem o radical $\cdot\text{Q}^-$ como intermediário. O radical $\cdot\text{Q}^-$ pode, embora com baixa probabilidade, passar um elétron ao O_2 na reação



O radical livre superóxido assim gerado é altamente reativo; sua formação também leva à produção do radical livre hidroxila, $\cdot\text{OH}$, ainda mais reativo (Figura 19-18).

Espécies reativas de oxigênio podem provocar sérios danos, reagindo com enzimas, lipídeos de membranas e ácidos nucleicos e os danificando. Em mitocôndrias que respiram ativamente, de 0,2 a 2% do oxigênio utilizado na respiração formam $\cdot\text{O}_2^-$ – mais do que suficiente para ter efeitos letais, a não ser que o radical livre seja rapidamente descartado. Os fatores que diminuem a velocidade de fluxo de elétrons pela cadeia respiratória aumentam a formação de superóxido, talvez por prolongarem o tempo de vida do $\cdot\text{O}_2^-$ gerado no ciclo Q. A formação de ERO é favorecida quando duas condições são satisfeitas: (1) as mitocôndrias não estão pro-

duzindo ATP (por falta de ADP ou de O_2) e, portanto, têm grande força próton-motriz e elevada razão QH_2/Q e (2) e há uma alta razão NADH/NAD^+ na matriz. Nessas situações, a mitocôndria está sob estresse oxidativo – há mais elétrons disponíveis para entrar na cadeia respiratória do que aquele número que pode imediatamente ser passado para o oxigênio. Quando o suprimento de doadores de elétrons (NADH) é equiparado àquele de aceptores de elétrons, existe menos estresse oxidativo, e a produção de ERO é muito reduzida. Embora a superprodução de ERO seja obviamente prejudicial, baixos níveis de ERO podem ser usados pela célula como um sinal que reflete o suprimento insuficiente de oxigênio (hipoxia), desencadeando ajustes metabólicos (ver Figura 19-34).

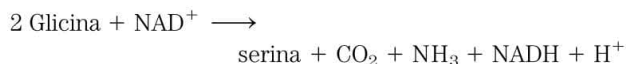
Para impedir o dano oxidativo induzido pelo $\cdot\text{O}_2^-$, as células têm a enzima **superóxido-dismutase**, que catalisa a reação



O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) assim gerado torna-se inofensivo pela ação da **glutaciona-peroxidase** (Figura 19-18). A glutaciona-redutase recicla a glutaciona oxidada para sua forma reduzida, usando elétrons do NADPH gerado pela nicotinamida-nucleotídeo-transidrogenase (na mitocôndria) ou pela via das pentoses-fosfato (no citosol; ver Figura 14-21). A glutaciona reduzida também serve para manter os grupos sulfidril das proteínas em seu estado reduzido, impedindo alguns dos efeitos deletérios do estresse oxidativo.

As mitocôndrias vegetais têm mecanismos alternativos para oxidar NADH

As mitocôndrias vegetais suprem a célula com ATP durante períodos de baixa iluminação ou escuridão por mecanismos completamente análogos àqueles usados por organismos não fotossintéticos. Na presença de luz, a principal fonte de NADH mitocondrial é uma reação em que a glicina, produzida por um processo conhecido como fotorrespiração, é convertida em serina (ver Figura 20-48):



Por razões discutidas no Capítulo 20, as plantas precisam realizar esta reação mesmo quando elas não precisam de NADH para a produção de ATP. Para regenerar NAD^+ a partir de NADH desnecessário, as mitocôndrias dos vegetais (e de alguns fungos e protistas) transferem elétrons do NADH diretamente à ubiquinona e da ubiquinona diretamente para o O_2 , desviando dos complexos III e IV e suas bombas de prótons. Nesse processo, a energia do NADH é dissipada como calor, que, algumas vezes, pode ser de valor para a planta (Quadro 19-2). A oxidação de NADH *resistente a cianeto* é apanágio dessa via singular de transferência de elétrons em vegetais; ao contrário da citocromo-oxidase (complexo IV), essa enzima alternativa QH_2 -oxidase não é inibida por cianeto.

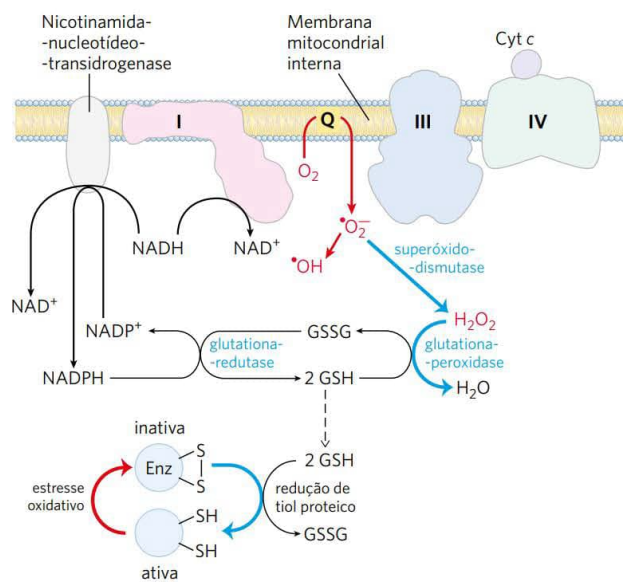


FIGURA 19-18 Formação de ERO nas mitocôndrias e defesas mitocondriais. Quando a taxa de entrada de elétrons na cadeia respiratória e a taxa de transferência de elétrons ao longo da cadeia não são coordenadas, a produção do radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) aumenta nos complexos I e III à medida que o radical ubiquinona parcialmente reduzido ($\cdot\text{Q}^-$) doa um elétron para o O_2 . O superóxido atua sobre a aconitase, uma proteína 4Fe-4S (não mostrada), para liberar Fe^{2+} . Na presença de Fe^{2+} , a reação de Fenton leva à formação do radical livre hidroxila ($\cdot\text{OH}$), fortemente reativo. As reações mostradas em azul defendem a célula contra os efeitos danosos do superóxido. A glutaciona reduzida (GSH; ver Figura 22-29) doa elétrons para a redução de H_2O_2 e para resíduos oxidados de Cys ($-\text{S}-\text{S}-$) de enzimas e outras proteínas; GSH é regenerada a partir da forma oxidada (GSSG) por redução utilizando NADPH.

QUADRO 19-2 Plantas quentes e malcheirosas e vias respiratórias alternativas

Muitas plantas com flor atraem insetos polinizadores, liberando moléculas odoríferas que imitam as fontes naturais de alimento dos insetos ou os locais potenciais de oviposição. Plantas polinizadas por moscas ou besouros que normalmente se alimentam ou depositam seus ovos em esterco ou carniça algumas vezes usam compostos de odor desagradável para atrair esses insetos.

Uma família de plantas com odor desagradável é a Araceae, que inclui filodendros, antúrios e *Symplocarpus*. Essas plantas têm flores muito pequenas, densamente arranjadas em uma estrutura ereta, o espádice, circundado por uma folha modificada, a espata. O espádice libera odores de carne podre ou de esterco. Antes da polinização, o espádice também aquece, em algumas espécies chegando até 20 a 40°C acima da temperatura ambiente. A produção de calor (termogênese) ajuda a evaporar moléculas odoríferas para melhor dispersão e, como carne apodrecida e esterco normalmente são mornos devido ao metabolismo hiperativo de microrganismos saprofíticos, o calor por si só também pode atrair os insetos. No caso do *Symplocarpus* do leste (Figura Q-1), que floresce no fim do inverno ou no início da primavera, quando a neve ainda cobre o chão, a termogênese permite ao espádice crescer em meio à neve.



FIGURA Q-1 *Symplocarpus*. [Fonte: Colin Purrington.]

Como é que o *Symplocarpus* aquece o espádice? As mitocôndrias das plantas, dos fungos e dos eucariotos unicelulares têm cadeias respiratórias essencialmente iguais aos dos animais, mas também têm uma via respiratória alternativa. Uma QH₂-oxidase transfere elétrons do conjunto de ubiquinona diretamente ao oxigênio, contornando as duas etapas translocadoras de prótons dos complexos III e IV (Figura Q-2). A energia que poderia ser conservada como ATP é, em vez disso, liberada como

RESUMO 19.1 A cadeia respiratória mitocondrial

- A teoria quimiosmótica fornece o arcabouço intelectual para o entendimento de muitas transduções biológicas de energia, incluindo a fosforilação oxidativa e a fotofosforilação. A energia do fluxo de elétrons é conservada pelo bombeamento concomitante de prótons através da membrana, produzindo um gradiente eletroquímico, a força próton-motriz.
- Em mitocôndrias, íons hidreto removidos de substratos (como α -cetoglutarato e malato) por desidrogenases ligadas ao NAD doam elétrons para a cadeia respiratória (transportadora de elétrons), que transfere os elétrons para o O₂ molecular, reduzindo-o a H₂O.
- Equivalentes redutores do NADH são passados por uma série de centros de Fe-S até a ubiquinona, que transfere os elétrons ao citocromo *b*, o primeiro carreador do complexo III. Nesse complexo, os elétrons seguem duas vias separadas por meio de dois citocromos tipo *b* e do citocromo *c*₁ para um centro de Fe-S. O centro de Fe-S passa elétrons, um de cada vez, para o citocromo *c* e daí para o complexo IV, a citocromo-oxidase. Essa enzima, que, além de conter cobre, também contém citocromos *a* e *a*₃, acumula elétrons e então os passa ao O₂, reduzindo-o a H₂O.
- Alguns elétrons entram nesta cadeia de carreadores por vias alternativas. O succinato é oxidado pela succinato-desidrogenase (complexo II), que contém uma flavoproteína que passa elétrons por vários centros de Fe-S até a ubiquinona. Os elétrons derivados da oxidação de ácidos graxos passam para a ubiquinona por meio da

flavoproteína transferidora de elétrons. A oxidação do glicerol-fosfato e do di-hidroorotato também envia elétrons para a cadeia respiratória via QH₂.

- Espécies reativas de oxigênio potencialmente danosas produzidas nas mitocôndrias são inativadas por um conjunto de enzimas protetoras, incluindo a superóxido-dismutase e a glutatona-peroxidase. Baixos níveis de ERO servem como sinais, coordenando a fosforilação oxidativa mitocondrial com outras vias metabólicas.
- Plantas, fungos e eucariotos unicelulares têm, além da via típica para a transferência de elétrons acoplada à síntese de ATP, uma via alternativa, não acoplada, que recicla o excesso de NADH a NAD⁺.

19.2 Síntese de ATP

De que forma um gradiente de concentração de prótons se transforma em ATP? Foi visto que a transferência de elétrons libera e a força próton-motriz conserva energia livre mais do que suficiente (cerca de 190 kJ) por “mol” de par de elétrons para impulsionar a formação de um mol de ATP, que requer cerca de 50 kJ (p. 509). Portanto, a fosforilação oxidativa mitocondrial não impõe nenhum problema termodinâmico. Todavia, qual é o mecanismo químico que acopla o fluxo de prótons com a fosforilação?

No modelo quimiosmótico, oxidação e fosforilação estão obrigatoriamente acopladas

O **modelo quimiosmótico**, proposto por Peter Mitchell, é o paradigma para o acoplamento energético. De acordo com

calor. As mitocôndrias vegetais também têm uma NADH-desidrogenase alternativa, insensível à rotenona (um inibidor do complexo I; ver Tabela 19-4). Essa desidrogenase transfere elétrons do NADH na matriz diretamente à ubiquinona, contornando o complexo I e o bombeamento de prótons a ele associado. As mitocôndrias vegetais têm, ainda, outra NADH-desidrogenase, na face externa da membrana interna, que transfere elétrons do NADH no espaço intermembrana para a ubiquinona,

novamente contornando o complexo I. Assim, quando os elétrons entram na via respiratória alternativa por meio da NADH-desidrogenase insensível à rotenona, da NADH-desidrogenase externa ou da succinato-desidrogenase (complexo II) e passam para o O_2 pela oxidase alternativa resistente ao cianeto, a energia não é conservada como ATP, mas liberada como calor. Um *Symplocarpus* pode usar o calor para derreter a neve, produzir um cheiro fétido ou atrair besouros ou moscas.

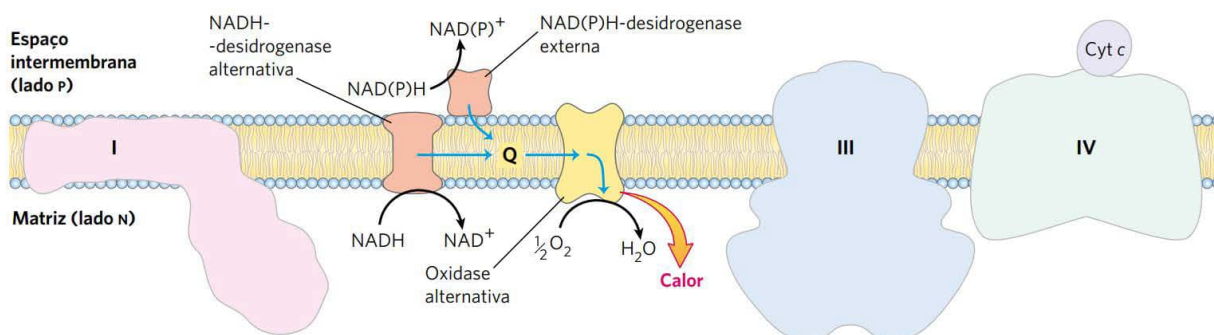


FIGURA Q-2 Carreadores de elétrons da membrana interna de mitocôndrias vegetais. Os elétrons podem fluir pelos complexos I, III e IV, como nas mitocôndrias animais, ou por carreadores alternativos específicos das plantas, pelas vias mostradas pelas setas azuis.

o modelo (**Figura 19-19**), a energia eletroquímica inerente à diferença de concentração de prótons e à separação de cargas entre os dois lados da membrana mitocondrial interna – a força próton-motriz – impulsiona a síntese de ATP, à medida que os prótons fluem passivamente de volta à ma-

triz, por meio de um poro para prótons na **ATP-sintase**. Para enfatizar esse papel crucial da força próton-motriz, a equação para síntese de ATP é às vezes escrita

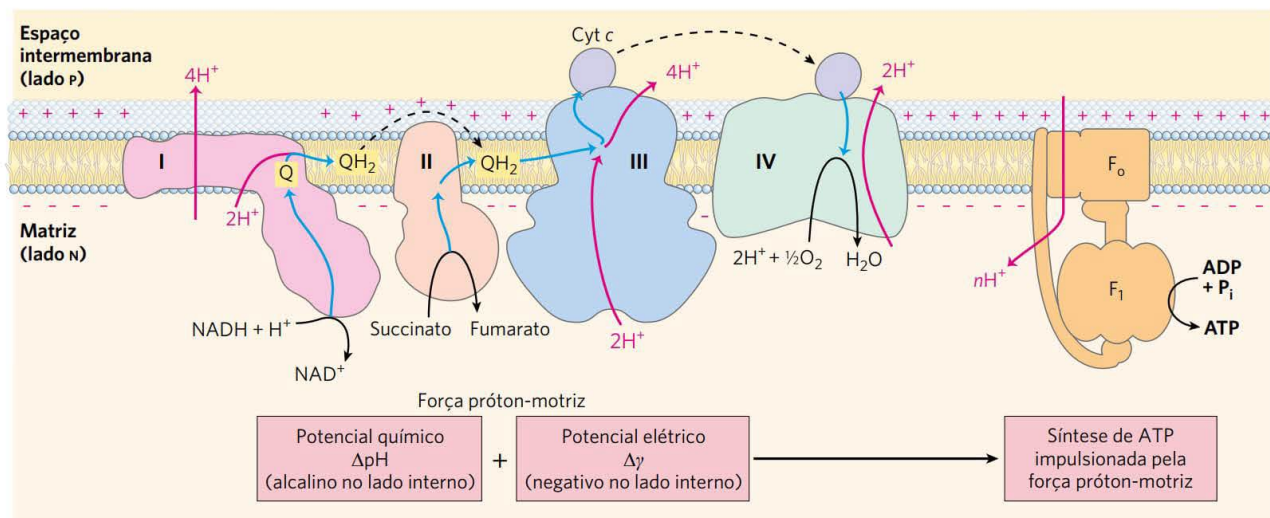


FIGURA 19-19 Modelo quimiosmótico. Nesta simples representação da teoria quimiosmótica aplicada às mitocôndrias, os elétrons do NADH e de outros substratos oxidáveis passam por meio de uma cadeia de carreadores assimetricamente arranjados na membrana interna. O fluxo de elétrons é acompanhado pela transferência de prótons através da membrana, produzindo tanto um gradiente químico (ΔpH) quanto um gradiente elétrico ($\Delta \psi$) (combinados, a força próton-motriz). A membrana mitocondrial interna é impermeável a prótons; os prótons só podem retornar à matriz através de canais específicos de prótons (F_o). A força próton-motriz que direciona os prótons de volta para a matriz proporciona a energia para a síntese de ATP, catalisada pelo complexo F_1 , associado ao F_o .



Peter Mitchell, 1920-1992
[Fonte: AP Photo.]

Mitchell usou o termo “quimiosmótico” para descrever reações enzimáticas que envolvem, simultaneamente, uma reação química e um processo de transporte, e o processo global é muitas vezes denominado “acoplamento quimiosmótico”. O acoplamento refere-se à conexão *obrigatória* entre a síntese mitocondrial de ATP e o fluxo de elétrons pela cadeia respiratória; nenhum dos dois processos pode prosseguir sem o outro. A definição operacional de

acoplamento é mostrada na **Figura 19-20**. Quando mitocôndrias isoladas são suspensas em um tampão contendo ADP, P_i e um substrato oxidável, como succinato, três processos facilmente mensuráveis ocorrem: (1) o substrato é oxidado (succinato produz fumarato), (2) o O_2 é consumido e (3) o ATP é sintetizado. O consumo de oxigênio e a síntese de ATP dependem da presença de um substrato oxidável (nesse caso, o succinato), assim como de ADP e P_i .

Uma vez que a oxidação do substrato impulsiona a síntese de ATP, inibidores da transferência de elétrons bloqueiam a síntese de ATP (Figura 19-20a). O contrário também é verdadeiro: a inibição da síntese de ATP bloqueia a transferência de elétrons em mitocôndrias intactas. Quando mitocôndrias isoladas recebem O_2 e substratos oxidáveis, mas não ADP (Figura 19-20b), não pode haver síntese de ATP e a transferência de elétrons para o O_2 não ocorre. Henry Lardy, pioneiro no uso de antibióticos para explorar a função mitocondrial, demonstrou o acoplamento entre a oxidação e a fosforilação usando oligomicina e venturicidina, antibióticos tóxicos que se ligam à ATP-sintase nas mitocôndrias. Esses compostos são inibidores potentes da síntese de ATP e da transferência de elétrons pela cadeia de transportadores até o O_2 (Figura 19-20b). Como se sabe que



Henry Lardy, 1917-2010
[Fonte: © cortesia de D. L. Nelson.]

a oligomicina não interage diretamente com os carregadores de elétrons, mas com a ATP-sintase, segue-se que a transferência de elétrons e a síntese de ATP são obrigatoriamente acopladas: nenhuma reação ocorre sem a outra.

A teoria quimiosmótica explica prontamente a dependência da transferência de elétrons em relação à síntese de ATP nas mitocôndrias. Quando o fluxo de prótons para dentro da matriz através do canal proteico da ATP-sintase é bloqueado (p. ex., com oligomicina), não existe nenhum caminho para o retorno dos prótons para a matriz, e a exatidão continuada de prótons da matriz governada pela atividade da cadeia respiratória gera um grande gradiente de prótons. A força próton-motriz acumula-se até que o custo (energia livre) de bombear prótons para fora da matriz contra esse gradiente se iguale ou exceda a energia liberada pela transferência de elétrons do NADH ao O_2 . Nesse ponto,

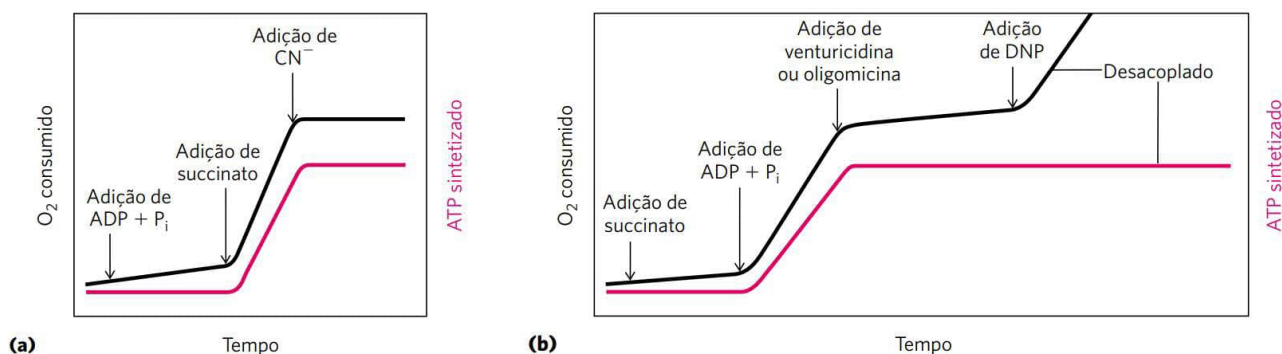


FIGURA 19-20 Acoplamento da transferência de elétrons e da síntese de ATP em mitocôndrias. Em experimentos para a demonstração do acoplamento, as mitocôndrias são suspensas em um meio tamponado, e um eletrodo de O_2 monitora o consumo de O_2 . Em intervalos, amostras são retiradas e analisadas para a presença de ATP. **(a)** A adição isolada de ADP e P_i resulta em pequeno ou nenhum aumento da respiração (consumo de O_2 ; em preto) ou da síntese de ATP (em cor-de-rosa). Quando succinato é adicionado, a respiração inicia imediatamente e ATP é sintetizado. A adição de cianeto (CN^-), que bloqueia a transferência de elétrons entre a citocromo-oxidase (complexo IV) e o O_2 , inibe tanto a respiração quanto a síntese de ATP. **(b)** Mitocôndrias providas de succinato respiram e sintetizam ATP somente quando ADP e P_i são adicionados. A adição posterior de venturicidina ou oligomicina, inibidores da ATP-sintase, bloqueia a síntese de ATP e a respiração. Dinitrofenol (DNF) é um desacoplador, permitindo que a respiração continue sem a síntese de ATP.

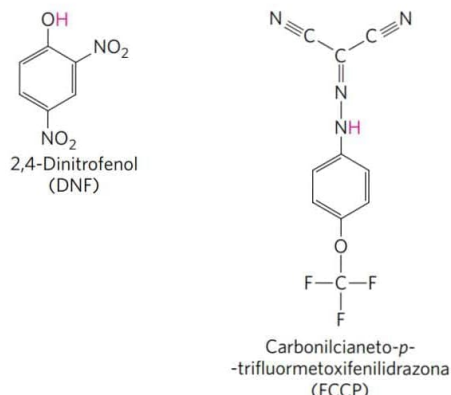


FIGURA 19-21 Dois desacopladores químicos da fosforilação oxidativa. Tanto DNF quanto FCCP têm um próton dissociável e são muito hidrofóbicos. Eles carregam prótons através da membrana mitocondrial interna, dissipando o gradiente de prótons. Ambos também desacoplam a fotofosforilação.

o fluxo de elétrons deve parar; a energia livre para o processo global de fluxo de elétrons acoplado ao bombeamento de prótons torna-se zero, e o sistema está em equilíbrio.

Certas condições e reagentes podem, no entanto, desacoplar a oxidação da fosforilação. Quando mitocôndrias intactas são rompidas por tratamento com detergentes ou por ação física, os fragmentos de membrana resultantes ainda podem catalisar a transferência de elétrons do succinato ou do NADH para o O_2 , mas nenhuma síntese de ATP está acoplada a essa respiração. Alguns compostos químicos causam o desacoplamento sem romper a estrutura mitocondrial. Desacopladores químicos incluem o 2,4-dinitrofenol (DNF) e o carbonilcianeto-*p*-trifluormetoxifenilidrazona (FCCP) (Tabela 19-4; **Figura 19-21**), ácidos fracos com propriedades hidrofóbicas que lhes permitem difundir facilmente através das membranas mitocondriais. Depois de entrarem na matriz na forma protonada, eles podem liberar um próton, dissipando, assim, o gradiente de prótons. A estabilização por ressonância desloca a carga nas formas aniônicas, tornando-as suficientemente hidrofóbicas para se difundirem de volta através da membrana, onde elas podem captar um próton e repetir o processo. Os ionóforos, como a valinomicina (ver Figura 11-42), permitem que íons inorgânicos passem facilmente através das membranas. Eles desacoplam a transferência de elétrons da fosforilação oxidativa, dissipando a contribuição elétrica ao gradiente eletroquímico através da membrana mitocondrial.

Uma previsão da teoria quimiosmótica é que, devido ao papel da transferência de elétrons na síntese de ATP mitocondrial ser simplesmente bombear prótons para criar o gradiente eletroquímico da força próton-motriz, um gradiente de prótons artificialmente criado deveria ser capaz de substituir a transferência de elétrons no desencadeamento da síntese de ATP. Isso foi confirmado experimentalmente (**Figura 19-22**). Mitocôndrias manipuladas de forma a impor uma diferença de concentração de prótons e uma separação de cargas através da membrana interna sintetizam ATP na ausência de um substrato oxidável; a força próton-motriz sozinha é suficiente para gerar a síntese de ATP.

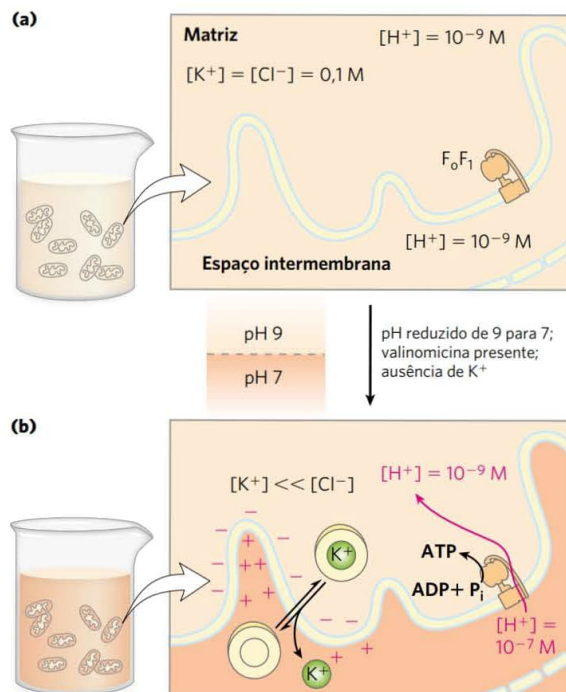


FIGURA 19-22 Evidência para o papel de um gradiente de prótons na síntese de ATP. Um gradiente eletroquímico imposto artificialmente pode impulsionar a síntese de ATP na ausência de um substrato oxidável como doador de elétrons. Neste experimento de duas etapas, (a) mitocôndrias isoladas são primeiramente incubadas em um tampão de pH 9 contendo KCl 0,1 M. Um lento vazamento de tampão e KCl para dentro das mitocôndrias após um certo tempo deixa a matriz em equilíbrio com o meio circundante. Nenhum substrato oxidável está presente. (b) As mitocôndrias são agora retiradas do tampão de pH 9 e ressuspendidas em tampão de pH 7 contendo valinomicina, na ausência de KCl. A mudança de tampão cria uma diferença de duas unidades de pH através da membrana mitocondrial interna. O efluxo de K^+ , carregado (por valinomicina) a favor de seu gradiente de concentração sem um contra-íon, cria um equilíbrio de carga através da membrana (matriz negativa). A soma do potencial químico proporcionado pela diferença de pH e do potencial elétrico proporcionado pela separação de cargas é uma força próton-motriz grande o suficiente para sustentar a síntese de ATP na ausência de um substrato oxidável.

A ATP-sintase tem dois domínios funcionais, F_0 e F_1



Efraim Racker, 1913-1991
[Fonte: Divisão de Coleções Manuscritas e Raras, Cornell University Library.]

A ATP-sintase mitocondrial é uma ATPase do tipo F (ver Figura 11-37b), similar em estrutura e mecanismo às ATP-sintases de bactérias e (como veremos nos Capítulos 20) cloroplastos. Esse grande complexo enzimático da membrana mitocondrial interna catalisa a formação de ATP a partir de ADP e P_i , impulsionada pelo fluxo de prótons do lado P para o lado N da membrana (Equação 19-10). A ATP-sintase, também chamada de complexo V, tem dois componentes distintos:

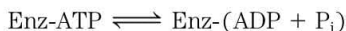
F_1 , uma proteína periférica de membrana, e F_o (o indicando sensível à oligomicina), integral à membrana. F_1 , o primeiro fator reconhecido como essencial para a fosforilação oxidativa, foi identificado e purificado por Efraim Racker e colaboradores no começo da década de 1960.

No laboratório, pequenas vesículas de membrana formadas a partir das membranas mitocondriais internas realizam a síntese de ATP acoplada à transferência de elétrons. Quando F_1 é gentilmente extraído, as vesículas “desnudas” ainda contêm cadeias respiratórias intactas e a porção F_o da ATP-sintase. As vesículas podem catalisar a transferência de elétrons do NADH ao O_2 , mas não podem produzir um gradiente de prótons: F_o tem um poro para prótons por meio do qual os prótons vazam tão rapidamente quanto são bombeados pela transferência de elétrons, e, sem um gradiente de prótons, as vesículas desprovidas de F_1 não podem produzir ATP. O F_1 isolado catalisa a hidrólise de ATP (o reverso da síntese), tendo sido, assim, originalmente chamado de **F_1 -ATPase**. Quando F_1 purificado é adicionado de volta às vesículas, ele associa-se novamente com F_o , fechando seu poro de prótons e restaurando a capacidade da membrana de acoplar a transferência de elétrons à síntese de ATP.

O ATP é estabilizado em relação ao ADP na superfície de F_1

Experimentos de troca de isótopos com F_1 purificado revelam um fato notável sobre o mecanismo catalítico da enzima: na superfície da enzima, a reação $ADP + P_i \rightleftharpoons ATP + H_2O$ é prontamente reversível – a variação de energia livre para a síntese de ATP é próxima de zero. Quando o ATP é hidrolisado por F_1 na presença de água marcada com ^{18}O , o P_i liberado contém um átomo de ^{18}O . Uma medida cuidadosa do conteúdo de ^{18}O do P_i formado *in vitro* pela hidrólise de ATP catalisada por F_1 revela que o P_i tem não um, mas três ou quatro átomos de ^{18}O (**Figura 19-23**). Isso indica que a ligação pirofosfato na extremidade do ATP é quebrada e refeita repetidamente antes que o P_i deixe a superfície da enzima. Com o P_i livre para se deparar com seu sítio de ligação, cada hidrólise insere ^{18}O aleatoriamente em uma de quatro posições na molécula. Essa reação de troca ocorre em complexos $F_o F_1$ não energizados (sem gradiente de prótons) e com F_1 isolado – a troca não requer acréscimo de energia.

Estudos cinéticos das taxas iniciais de síntese e hidrólise de ATP confirmam a conclusão de que $\Delta G'^{\circ}$ para a síntese de ATP na enzima é próximo de zero. A partir das taxas medidas de hidrólise ($k_1 = 10 \text{ s}^{-1}$) e síntese ($k_{-1} = 24 \text{ s}^{-1}$), a constante de equilíbrio calculada para a reação



é

$$K'_{\text{eq}} = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{24 \text{ s}^{-1}}{10 \text{ s}^{-1}} = 2,4$$

A partir deste K'_{eq} , o $\Delta G'^{\circ}$ aparente calculado é próximo de zero. Isso é muito diferente do K'_{eq} de cerca de 10^5 ($\Delta G'^{\circ} = -30,5 \text{ kJ/mol}$) para a hidrólise de ATP livre em solução (não na superfície da enzima).

O que explica essa enorme diferença? A ATP-sintase estabiliza o ATP em relação a $ADP + P_i$, ligando o ATP mais fortemente e liberando energia suficiente para contrabalançar o custo da produção de ATP. Medidas cuidadosas das constantes de ligação mostram que $F_o F_1$ liga ATP com afinidade muito alta ($K_d \leq 10^{-12} \text{ M}$) e ADP com afinidade muito mais baixa ($K_d \approx 10^{-5} \text{ M}$). A diferença em K_d corresponde a uma diferença de cerca de 40 kJ/mol em energia de ligação, e essa energia de ligação impulsiona o equilíbrio em direção à formação do produto ATP.

O gradiente de prótons impulsiona a liberação de ATP a partir da superfície da enzima

Embora a ATP-sintase equilibre o ATP com $ADP + P_i$, na ausência de um gradiente de prótons, o ATP recém-sintetizado não deixa a superfície da enzima. É o gradiente de prótons que faz a enzima liberar o ATP formado em sua superfície. O diagrama de coordenadas de reação do processo

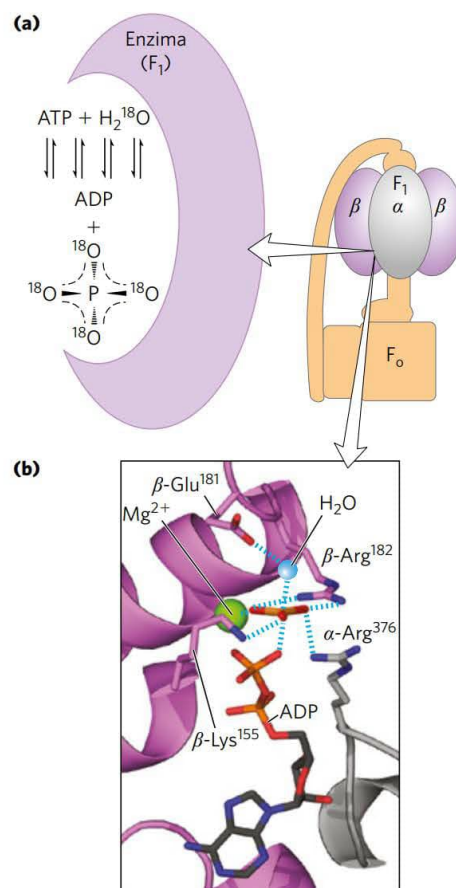


FIGURA 19-23 Mecanismo catalítico de F_1 . (a) Um experimento de troca de ^{18}O . F_1 solubilizado de membranas mitocondriais é incubado com ATP na presença de água marcada com ^{18}O . Em intervalos, uma amostra da solução é retirada e analisada para detectar a incorporação de ^{18}O no P_i produzido a partir da hidrólise de ATP. Em minutos, o P_i contém três ou quatro átomos de ^{18}O , indicando que tanto a hidrólise de ATP quanto a síntese de ATP ocorreram diversas vezes durante a incubação. (b) Provável complexo do estado de transição para a hidrólise e a síntese de ATP pela ATP-sintase. A subunidade α é mostrada em cinza, e a subunidade β , em roxo. Os resíduos carregados positivamente β -Arg¹⁸² e α -Arg³⁷⁶ coordenam-se com dois oxigênios do intermediário fosfato pentavalente; β -Lys¹⁵⁵ interage com um terceiro oxigênio, e o íon Mg^{2+} estabiliza ainda mais o intermediário. A esfera azul representa o grupo que sai (H_2O). Estas interações resultam no pronto equilíbrio de ATP e $ADP + P_i$ no sítio ativo. [Fonte: (b) derivado de PDB ID 1BMF, J. P. Abrahams et al., *Nature* 370:621, 1994.]

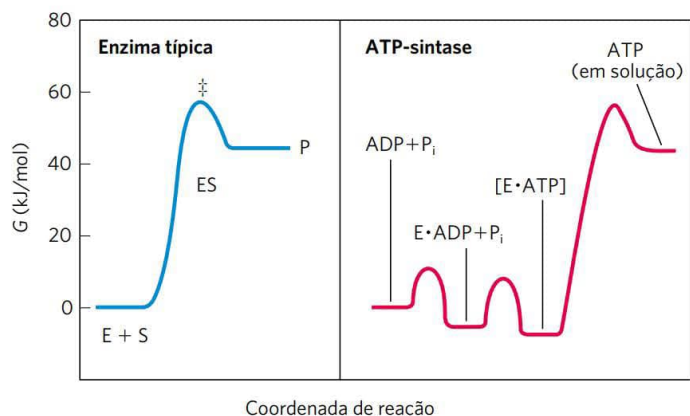


FIGURA 19-24 Diagramas de coordenadas de reação para a ATP-sintase e para uma enzima mais típica. Em uma reação típica catalisada por enzima (à esquerda), alcançar o estado de transição (\ddagger) entre substrato e produtos é a principal barreira energética a ser superada. Na reação catalisada pela ATP-sintase (à direita), a liberação de ATP a partir da enzima, e não a formação de ATP, é a principal barreira energética. A variação de energia livre para a formação de ATP a partir de ADP e P_i em solução aquosa é grande e positiva, porém, na superfície da enzima, a ligação muito firme do ATP proporciona energia de ligação suficiente para trazer a energia livre do ATP ligado à enzima para perto daquela de $ADP + P_i$, de forma que a reação é prontamente reversível. A constante de equilíbrio é próxima de 1. A energia livre necessária para a liberação do ATP é fornecida pela força próton-motriz.

(Figura 19-24) ilustra a diferença entre o mecanismo da ATP-sintase e aquele de muitas outras enzimas que catalisam reações endergônicas.

Para a síntese continuada de ATP, a enzima precisa oscilar entre uma forma que liga ATP muito fortemente e uma forma que libera ATP. Estudos químicos e cristalográficos da ATP-sintase revelaram a base estrutural para essa alternância de função.

Cada subunidade β da ATP-sintase pode assumir três diferentes conformações



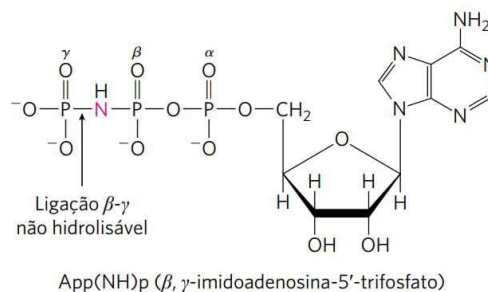
John E. Walker
[Fonte: © Findlay Kember/
Associated Press.]

O F_1 mitocondrial tem nove subunidades de cinco diferentes tipos, com a composição $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$. Cada uma das três subunidades β tem um sítio catalítico para a síntese de ATP. A determinação cristalográfica da estrutura de F_1 por John E. Walker e colaboradores revelou detalhes estruturais muito úteis para explicar o mecanismo catalítico da enzima. A porção de F_1 em forma de maçaneta é uma esfera achatada, com 8 nm de altura e 10 nm de largura, consistindo em subunidades α e β alternadas, arranjadas como os gomos de uma laranja (Figura 19-25a-c).

Os polipeptídeos que formam a haste na estrutura cristalina de F_1 estão assimetricamente arranjados, com um domínio da única subunidade γ constituindo o eixo central que passa através de F_1 e um outro domínio de γ associado principalmente com uma das três subunidades β , denominada β -vazio (Figura 19-25b). Embora as sequências de aminoácidos das três subunidades β sejam idênticas, suas conformações diferem, em parte devido à associação da subunidade γ com apenas uma das três.

As diferenças conformacionais entre as subunidades β se estendem a diferenças em seus sítios de ligação de ATP/ADP. Quando os pesquisadores cristalizaram a proteína na presença de ADP e App(NH)p, um análogo estrutural bastante semelhante ao ATP que não pode ser hidrolisado pela atividade ATPásica de F_1 , o sítio de ligação de uma das três

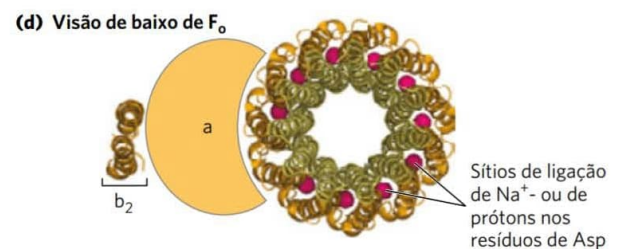
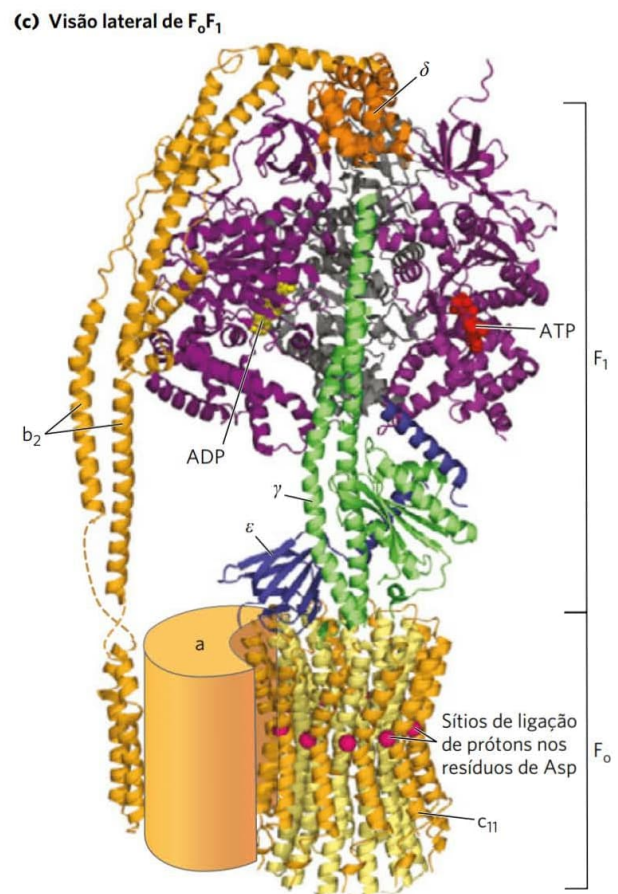
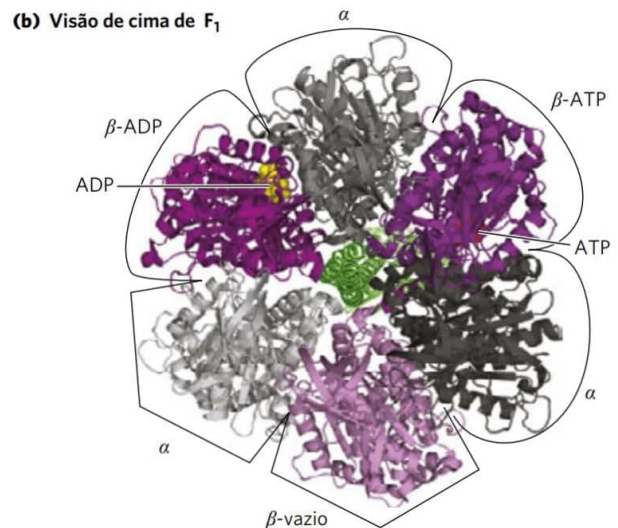
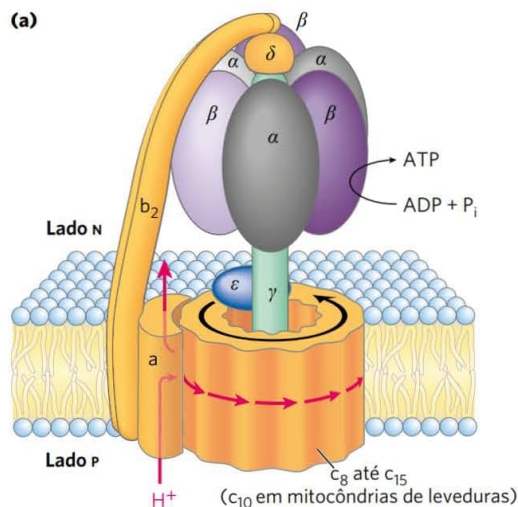
subunidades β foi preenchido com App(NH)p, o segundo foi preenchido com ADP e o terceiro estava vazio. As conformações das subunidades β correspondentes são designadas β -ATP, β -ADP e β -vazio (Figura 19-25b). Essa diferença na ligação de nucleotídeos entre as três subunidades é crítica para o mecanismo do complexo.



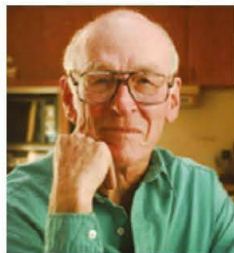
O complexo F_o , com seu poro de prótons, é composto por três subunidades, a, b e c, na proporção ab_2c_n , em que n varia de 8 a 15, dependendo da espécie. A subunidade c é um polipeptídeo pequeno (M_r 8.000), muito hidrofóbico, consistindo quase que inteiramente em duas hélices transmembrana, com uma pequena alça se estendendo do lado da matriz da membrana. A estrutura cristalina de F_oF_1 de leveduras mostra 10 subunidades c, cada uma com duas hélices transmembrana aproximadamente perpendiculares ao plano da membrana e arranjadas em dois círculos concêntricos. O círculo mais interno é composto por hélices aminoterminais de cada subunidade c; o círculo mais externo, com cerca de 55 Å de diâmetro, é composto pelas hélices carboxiterminais. As subunidades c neste anel c giram juntas como uma unidade ao redor de um eixo perpendicular à membrana. As subunidades ϵ e γ de F_1 formam uma “perna com pé” que se projeta do lado de baixo (do lado da membrana) de F_1 e que se sustenta firmemente sobre o anel das subunidades c. A subunidade a consiste em várias hélices hidrofóbicas que atravessam a membrana em íntima associação com uma das subunidades c no anel c. O desenho esquemático na Figura 19-25a combina a informação estrutural dos estudos de F_1 bovina, de F_oF_1 de leveduras e do anel c de *Ilyobacter tartaricus*, uma bactéria anaeróbica estrita.

FIGURA 19-25 Complexo de ATP-sintase mitocondrial. (a) Uma visão em desenho do complexo F_0F_1 . (b) F_1 visto de cima (i.e., do lado N da membrana), mostrando as três subunidades β (tons de roxo) e as três subunidades α (tons de cinza) e o eixo central (subunidade γ , em verde). Cada subunidade β , perto de sua interface com a subunidade α vizinha, tem um sítio de ligação de nucleotídeo crucial para a atividade catalítica. A subunidade γ única associa-se primariamente com um dos três pares $\alpha\beta$, forçando cada uma das subunidades β para conformações levemente diferentes, com diferentes sítios de ligação de nucleotídeos. Na enzima cristalina, uma subunidade (β -ADP) tem ADP (em amarelo) em seu sítio de ligação, a próxima (β -ATP) tem ATP (em vermelho) e a terceira (β -vazio) não tem qualquer nucleotídeo ligado.

(c) A enzima inteira vista de lado (no plano da membrana). A porção F_1 tem três subunidades α e três subunidades β , arranjadas como os gomos de uma laranja ao redor de um eixo central, a subunidade γ (em verde). (Duas subunidades α e uma subunidade β foram omitidas para expor a subunidade γ e os sítios de ligação para ATP e ADP nas subunidades β .) A subunidade δ confere sensibilidade à oligomicina para a ATP-sintase, e a subunidade ϵ pode servir para inibir sua atividade ATPásica sob algumas circunstâncias. A subunidade F_0 consiste em uma subunidade a e duas subunidades b , que ancoram o complexo F_0F_1 na membrana e atuam como estator, segurando as subunidades α e β no lugar. F_0 também inclui o anel c , composto por um número (8 a 15, dependendo da espécie) de subunidades c idênticas, proteínas hidrofóbicas pequenas. O anel c e a subunidade a interagem para prover uma rota transmembrana para prótons. Cada uma das subunidades c em F_0 tem um resíduo de Asp crítico perto do meio da membrana, que sofre protonação/desprotonação durante o ciclo catalítico da ATP-sintase. Aqui é mostrado o anel c_{11} homólogo da Na^+ -ATPase de *Illyobacter tartaricus*, cuja estrutura está bem determinada. Os sítios de ligação ao Na^+ , que correspondem aos sítios de ligação de prótons no complexo F_0F_1 , são mostrados com seus íons Na^+ ligados (esferas vermelhas). (d) Uma vista de F_0 perpendicular à membrana. Da mesma forma que em (c), as esferas vermelhas representam os sítios de ligação de Na^+ ou de prótons nos resíduos de Asp. [Fontes: F_1 : PDB ID 1BMF, J. P. Abrahams et al., *Nature* 370:621, 1994; PDB ID 1JNV, A. C. Hausrath et al., *J. Biol. Chem.* 276:47,227, 2001; PDB ID 2A7U, S. Wilkens et al., *Biochemistry* 44:11,786, 2005; PDB ID 2CLY, V. Kane Dickson et al., *EMBO J.* 25:2911, 2006. F_0 : PDB ID 1B9U, O. Dmitriev et al., *J. Biol. Chem.* 274:15,598, 1999. Anel c : PDB ID 1YCE, T. Meier et al., *Science* 308:659, 2005.]



A catálise rotacional é a chave para o mecanismo de alteração na ligação durante a síntese de ATP



Paul Boyer
[Fonte: Lacy Atkins/
Associated Press/AP
Images.]

Com base na cinética detalhada e em estudos de ligação das reações catalisadas por F_0F_1 , Paul Boyer propôs um mecanismo de **catálise rotacional**, no qual os três sítios ativos de F_1 se revezam catalisando a síntese de ATP (**Figura 19-26**). Uma dada subunidade β começa na conformação β -ADP, que liga ADP e P_i do meio circundante. A subunidade agora muda de conformação, assumindo a forma β -ATP, que se liga firmemente e estabiliza o ATP, gerando o pronto equilíbrio

de $ADP + P_i$ com ATP na superfície da enzima. Finalmente, a subunidade muda para a conformação β -vazio, que tem baixa afinidade por ATP, e o ATP recém-sintetizado deixa a superfície da enzima. Outra rodada de catálise começa quando essa subunidade novamente assume a forma β -ADP e liga ADP e P_i .

As mudanças conformacionais importantes nesse mecanismo são desencadeadas pela passagem de prótons pela porção F_0 da ATP-sintase. A corrente de prótons através do poro F_0 faz o cilindro de subunidades c e a subunidade γ a ele encaixada rodar ao redor do eixo longo de γ , que é perpendicular ao plano da membrana. A subunidade γ passa pelo centro do esferoide $\alpha_3\beta_3$, mantido estacionário em relação à superfície da membrana pelas subunidades b_2 e δ (**Figura 19-25a**). A cada rotação de 120° , a subunidade γ entra em contato com uma subunidade β diferente, e o contato força a subunidade β a tomar a conformação β -vazio.

As três subunidades β interagem, de modo que, quando uma assume a conformação β -vazio, sua vizinha em um dos lados *precisa* assumir a forma β -ADP e a outra vizinha a forma β -ATP. Assim, uma rotação completa da subunidade γ faz cada subunidade β passar por suas três conformações possíveis e, para cada rotação, três ATP são sintetizados e liberados da superfície da enzima.

Uma forte previsão desse **modelo de troca de ligação** é que a subunidade γ deveria rodar em uma direção quando F_0F_1 está sintetizando ATP e na direção oposta quando a enzima está hidrolisando ATP. Essa previsão de rotação com hidrólise de ATP foi confirmada em experimentos elegantes nos laboratórios de Masasuke Yoshida e Kazuhiko Kinosita, Jr. A rotação de γ em uma única molécula de F_1 foi observada microscopicamente, prendendo-se um polímero de actina fluorescente longo e fino a uma subunidade γ e observando seu movimento em relação a $\alpha_3\beta_3$ imobilizado em uma lâmina de microscópio, à medida que o ATP era hidrolisado. (A reversão esperada da rotação quando ATP está sendo sintetizado não pôde ser testada neste experimento; não há gradiente de prótons para impulsionar a síntese de ATP). Quando todo o complexo F_0F_1 (não apenas F_1) era utilizado em experimento semelhante, todo o anel de subunidades c rotava com a subunidade γ (**Figura 19-27**). O “eixo” rodava na direção prevista ao longo de 360° . A rotação não era contínua, mas ocorria em três etapas distintas de 120° . Conforme calculado a partir da taxa conhecida de hidrólise de ATP por uma molécula de F_1 e do arraste por fricção do longo polímero de actina, a eficiência desse mecanismo em converter energia química em movimento é próxima de 100%. Nas palavras de Boyer: “uma esplêndida máquina molecular”.

De que forma o fluxo de prótons pelo complexo F_0 produz movimento rotacional?

Um modelo plausível para explicar como o fluxo de prótons e o movimento rotacional estão acoplados no complexo F_0 é mostrado na **Figura 19-28**. As subunidades individuais

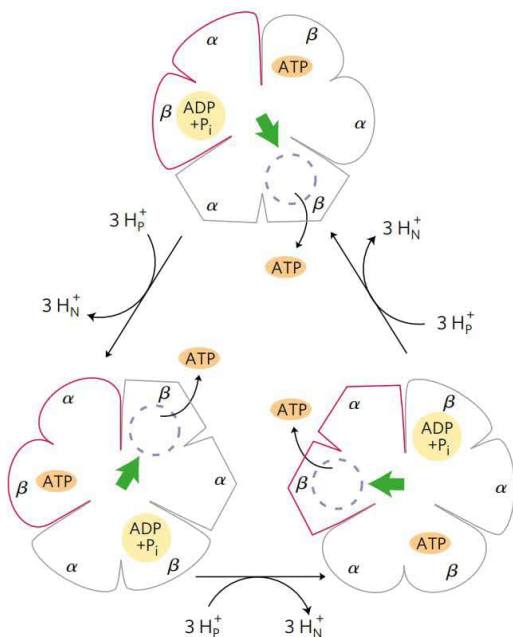


FIGURA 19-26 Modelo de troca de ligação para a ATP-sintase.

O complexo F_1 tem três sítios não equivalentes para ligação de nucleotídeos de adenina, um para cada par de subunidades α e β . A cada momento, um destes sítios está na conformação β -ATP (que liga firmemente ATP), um segundo está na conformação β -ADP (ligação frouxa) e um terceiro está na conformação β -vazio (ligação muito frouxa). Nesta visão a partir do lado N, a força próton-motriz causa a rotação do eixo central – a subunidade γ , mostrada como uma seta verde – que entra em contato com cada par de subunidades $\alpha\beta$ em sucessão. Isso produz uma mudança conformacional cooperativa, na qual o sítio β -ATP é convertido para a conformação β -vazio e o ATP se dissocia; o sítio β -ADP é convertido para a conformação β -ATP, que promove a condensação de $ADP + P_i$ ligados, para formar ATP; e o sítio β -vazio torna-se um sítio β -ADP, que liga frouxamente ADP e P_i vindos do solvente. Este modelo, baseado em achados experimentais, requer que pelo menos dois destes três sítios catalíticos alternem em atividade; o ATP não pode ser liberado de um sítio a não ser que (e até que) ADP e P_i se liguem ao outro sítio. Observe que a rotação ocorre no sentido reverso quando a ATP-sintase está atuando como uma ATPase, como no experimento mostrado na Figura 19-27.

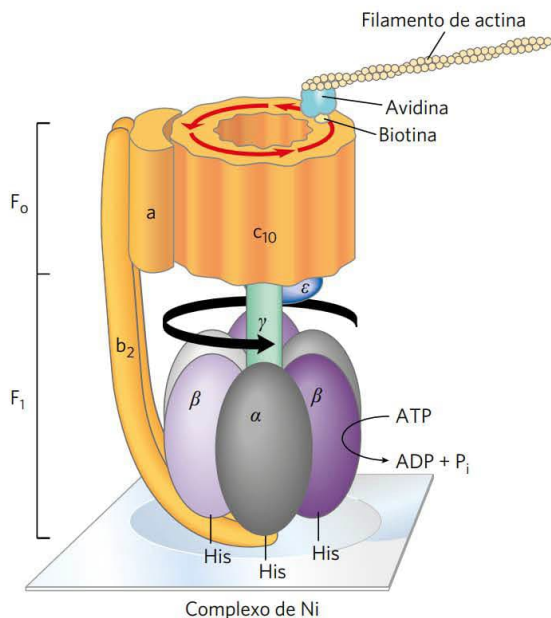
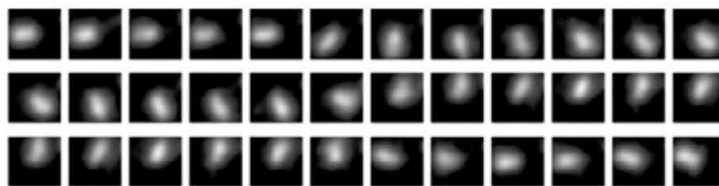


FIGURA 19-27 Demonstração experimental da rotação de F_0 e de γ . O F_1 geneticamente modificado para conter uma sequência de resíduos de His adere firmemente a uma lâmina de microscópio coberta com um complexo de Ni; a biotina é covalentemente ligada a uma subunidade c de F_0 . A proteína avidina, que liga firmemente a biotina, está ligada covalentemente a longos filamentos de actina marcada com uma sonda fluorescente. A ligação biotina-avidina agora liga filamentos de actina à subunidade c. Quando o ATP é fornecido como substrato para a atividade ATPásica de F_1 , observa-se o filamento marcado rodar continuamente em uma direção, provando que o cilindro F_0 de subunidades c gira. Em outro experimento, um filamento de actina fluorescente foi ligado diretamente à subunidade γ . A série de micrografias fluorescentes (ler da esquerda para a direita) mostra a posição do filamento de actina em intervalos de 133 ms. Observe que, à medida que o filamento gira, ele faz um salto discreto a cada cerca de 11 quadros de imagens. Supostamente, o cilindro e o eixo movem-se como uma unidade. [Fontes: desenho: informação obtida de Y. Sambongi et al., *Science* 286:1722, 1999. Micrografias: cortesia de Ryohei Yasuda e Kazuhiko Kinosita, de Yasuda et al., *Cell* 93:1117, 1998. © Elsevier.]



em F_0 estão arranjadas em um círculo ao redor de um miolo central, que está provavelmente preenchido com lipídeos de membrana. Em cada subunidade c, existe um importante resíduo de Asp (ou Glu) localizado perto do meio da membrana. Os prótons cruzam a membrana por uma rota feita de subunidades a e c. A subunidade a tem um meio canal de prótons conduzindo do citosol (lado P) para o meio da membrana, onde ele termina perto de um resíduo de Asp da subunidade c adjacente. Um próton difunde-se do lado P (onde a concentração de prótons é relativamente alta) ao longo desse meio-canais e se liga ao resíduo de Asp, removendo a carga negativa do grupo carboxila e, assim, deslocando um resíduo de Arg carregado positivamente que tinha

se associado com o Asp. Esse resíduo de Arg se desloca para o lado, formando uma interação com o Asp na subunidade c adjacente no anel e deslocando o próton daquele Asp; esse próton adjacente sai através do segundo meio-canais para o lado N, onde a concentração de prótons é relativamente baixa, completando o movimento de um próton equivalente do lado de fora para o lado de dentro da matriz. Agora, um outro próton entrou no meio canal no lado citosólico, moveu-se até o Asp na próxima subunidade c e o protonou, mais uma vez deslocando a Arg, que, por sua vez, desloca um próton da próxima subunidade c, e assim por diante. O movimento rotacional do anel c é o resultado de movimento térmico (Browniano), que se torna unidirecional

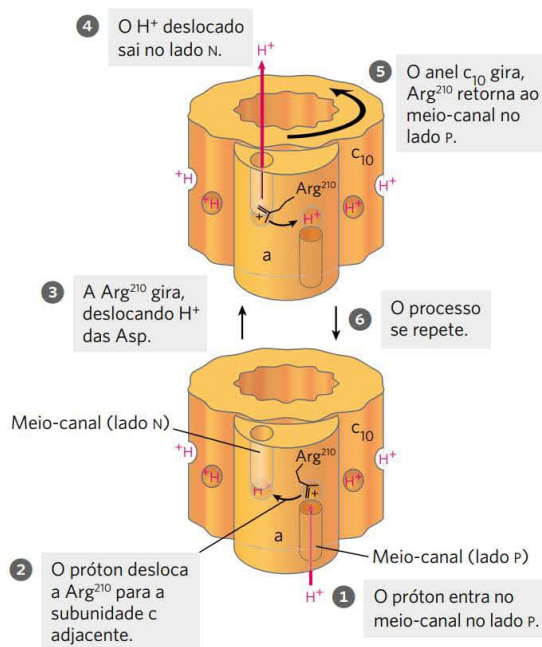


FIGURA 19-28 Um modelo para a rotação do anel c impulsionada por prótons. A subunidade a do complexo F_0 da ATP-sintase (ver Figura 19-25a) tem dois meio-canais hidrofílicos para prótons, um conduzindo do lado P para o meio da membrana e outro conduzindo do meio da membrana para o lado N (matriz). As subunidades c individuais em F_0 (10 na enzima de leveduras) estão arranjadas em um círculo ao redor de um miolo central. Cada subunidade c tem um importante resíduo de Asp aproximadamente no meio da membrana, que pode doar ou receber um próton (H^+ , em vermelho). A subunidade a tem uma cadeia lateral de Arg positivamente carregada, que forma uma interação eletrostática com o carboxilato de Asp negativamente carregado na subunidade c adjacente. Esta subunidade c é inicialmente posicionada de forma que um próton que entra no meio-canais no lado P (onde a concentração de prótons é relativamente alta) encontra e protona o resíduo de Asp, enfraquecendo sua interação com Arg. A cadeia lateral de Arg rota em direção ao resíduo protonado de Asp na próxima subunidade c e desloca o próton de sua carboxila, enquanto uma nova interação eletrostática Arg-Asp se forma. O próton deslocado move-se através do segundo meio-canais na subunidade a e é liberado no lado N. A subunidade c com seu resíduo de Asp desprotonado move-se de forma que seu par Arg-Asp fique de frente para o meio-canais no lado P, e um segundo ciclo começa: entrada de um próton, protonação de Asp, movimento de Arg e saída de um próton. A rotação do anel ocorre por movimento térmico (Browniano); o anel funciona como uma cremalheira. A orientação do gradiente de prótons dita o sentido do fluxo de prótons e torna a rotação do anel c basicamente unidirecional. [Fonte: PDB ID 1OH, E. Cabezon et al., *Nature Struct. Biol.* 10:744, 2003.]

QUADRO 19-3 MÉTODOS Microscopia de força atômica para visualizar as proteínas de membrana

Na **microscopia de força atômica (MFA)**, a ponta afiada de uma sonda presa a um suporte flexível é arrastada por uma superfície irregular como a de uma membrana (Figura Q-1). Interações eletrostáticas e de van der Waals entre a ponteira e a amostra produzem uma força que movimenta a sonda para cima e para baixo (na dimensão z), à medida que encontra montanhas e vales na amostra. Um feixe de *laser* refletido do suporte detecta movimentos tão pequenos quanto 1 Å. Em um tipo de microscópio de força atômica, a força na sonda é mantida constante (em relação a uma força padrão, na ordem de piconewtons) por um circuito de retroalimentação que faz a plataforma que sustenta a amostra subir ou descer para manter a força constante. Uma série de varreduras nas dimensões x e y (o plano da membrana) gera um mapa topográfico da superfície com uma resolução próxima à escala atômica – 0,1 nm na dimensão vertical, 0,5 a 1,0 nm nas dimensões laterais.

Em casos favoráveis, a MFA pode ser usada para estudar moléculas individuais de proteínas de membrana, como as subunidades c do complexo F_0 (Figura 19-29c, d).

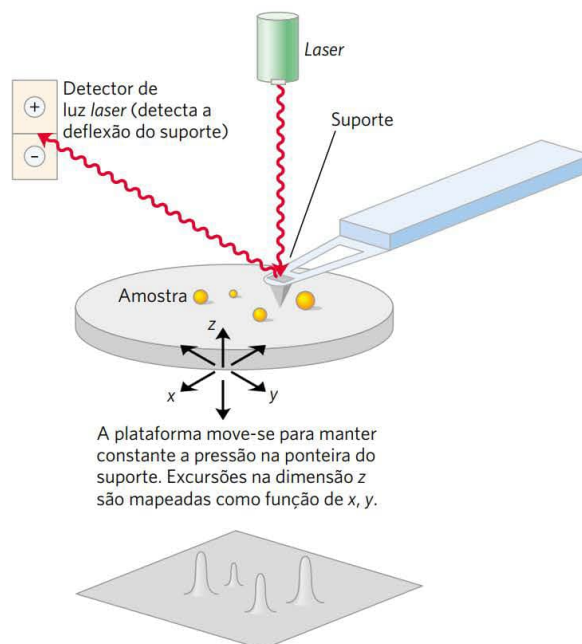
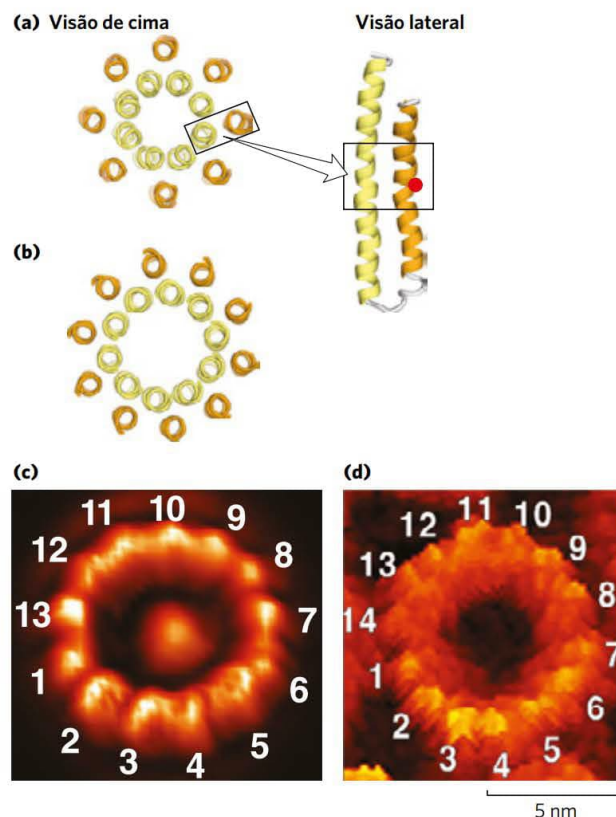


FIGURA Q-1 O princípio da microscopia de força atômica.

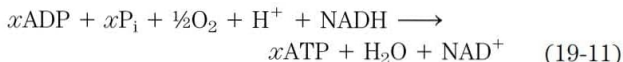
pela grande diferença na concentração de prótons através da membrana. O número de prótons que precisa ser transferido para produzir uma rotação completa do anel c é igual ao número de subunidades c no anel. Estudos do anel c por microscopia de força atômica (Quadro 19-3) ou por difração de raios X mostraram que o número de subunidades c é diferente em diferentes organismos (**Figura 19-29**). Em mitocôndrias bovinas, esse número é 8, em mitocôndrias de leveduras e em *Escherichia coli*, é 10, e o número de subunidades c pode atingir 15 na cianobactéria *Spirulina platensis*. A taxa de rotação em mitocôndrias intactas foi estimada em cerca de 6.000 rpm – 100 rotações por segundo.

FIGURA 19-29 Espécies diferentes têm números diferentes de subunidades c no anel c do complexo F_0 . A estrutura do anel c de várias espécies foi determinada por cristalografia por raios X. Cada hélice no anel central é a metade de uma subunidade c com formato de grampo de cabelo; o anel de hélices externo forma a outra metade da estrutura de grampo. O resíduo essencial de Asp na posição 61 é mostrado como um ponto vermelho. Visualizações do anel c perpendiculares à membrana mostram o número de subunidades c para (a) mitocôndrias bovinas (8 subunidades) e (b) mitocôndrias de leveduras (10). Microscopia de força atômica (ver Quadro 19-3) foi utilizada para visualizar os anéis c (c) de uma bactéria termófila, *Bacillus* espécie TA2.A1 (13 subunidades) e (d) de espinafre (14). De acordo com o modelo na Figura 19-28, números diferentes de subunidades c no anel c deveriam resultar em diferentes razões de ATP formado por par de elétrons que passam pela cadeia respiratória (diferentes razões P/O). [Fontes: (a) PDB ID 1OHH, E. Cabezon et al., *Nature Struct. Biol.* 10:744, 2003. (c) D. Matthies, et al., *J. Mol. Biol.* 388, 611, 2009. (d) H. Seelert et al., *Nature* 405:418, 2000. Reimpressa, com permissão, de Macmillan Publishers Ltd.]



O acoplamento quimiosmótico permite estequiometrias não integrais de consumo de O_2 e de síntese de ATP

Antes da aceitação geral do modelo quimiosmótico da fosforilação oxidativa, a pressuposição era de que a equação da reação global assumiria a seguinte forma:



com o valor de x – algumas vezes chamado de **razão P/O** ou **razão P/2e⁻** – sempre um número inteiro. Quando mitocôndrias intactas são suspensas em solução com um substrato oxidável, como succinato ou NADH, e são providas com O_2 , a síntese de ATP é facilmente mensurável, assim como o decréscimo de O_2 . A princípio, essas duas medidas deveriam produzir o número de ATP sintetizado por $\frac{1}{2}O_2$ consumido, a razão P/O. A maioria dos experimentos gerou razões P/O (ATP para $\frac{1}{2}O_2$) entre 2 e 3 quando NADH era o doador de elétrons e entre 1 e 2 quando succinato era o doador. Considerando a pressuposição de que P/O deveria ter um valor integral, a maioria dos pesquisadores concordou que as razões P/O devem ser de 3 para NADH e 2 para succinato e, durante anos, esses valores apareceram em artigos de pesquisa e em livros-texto.

Com a introdução do paradigma quimiosmótico para o acoplamento da síntese de ATP à transferência de elétrons, não havia qualquer requisito teórico para que P/O fosse um número inteiro. As questões relevantes sobre a estequiometria se tornaram: quantos prótons são bombeados para fora pela transferência de elétrons de um NADH ao O_2 e quantos prótons precisam fluir para dentro por meio do complexo F_0F_1 para propiciar a síntese de ATP? A medida de fluxos de prótons é complicada tecnicamente; o pesquisador precisa considerar a capacidade de tamponamento das mitocôndrias, o vazamento não produtivo de prótons através da membrana interna e o uso do gradiente de prótons para outras funções que não a síntese de ATP, como propiciar o transporte de substratos através da membrana mitocondrial interna (descrito a seguir). Os valores experimentais consensuais para o número de prótons bombeados para fora por par de elétrons são de 10 para NADH e 6 para succinato (que envia elétrons para a cadeia respiratória no nível da ubiquinona). O valor experimental mais amplamente aceito para o número de prótons necessários para possibilitar a síntese de uma molécula de ATP é 4, sendo que 1 é usado no transporte de P_i , ATP e ADP através da membrana mitocondrial (ver a seguir). Se 10 prótons são bombeados para fora por NADH e 4 precisam fluir para dentro para produzir 1 ATP, a razão P/O com base em prótons é 2,5 para NADH como doador de elétrons e 1,5 (6/4) para o succinato. Contudo, como veremos no Problema 2, a estequiometria dos prótons na síntese de ATP pela ATP-sintase depende do número de unidades c em F_0 , que varia de 8 a 15, dependendo da espécie.

A força próton-motriz energiza o transporte ativo

Embora o papel primário do gradiente de prótons nas mitocôndrias seja fornecer energia para a síntese de ATP, a

força próton-motriz também impulsiona vários processos de transporte essenciais à fosforilação oxidativa. A membrana mitocondrial interna geralmente é impermeável a espécies carregadas, mas dois sistemas específicos transportam ADP e P_i para dentro da matriz e ATP para o citosol (Figura 19-30).

A **adenina-nucleotídeo-translocase**, integral à membrana interna, liga ADP^{3-} no espaço intermembrana e o transporta para a matriz, em troca de uma molécula de ATP^{4-} , simultaneamente transportada para fora (ver Figura 13-11 para as formas iônicas de ADP e ATP). Como esse antiportador move quatro cargas negativas para fora para cada três que são movidas para dentro, sua atividade é favorecida pelo gradiente eletroquímico transmembrana, que confere à matriz uma carga líquida negativa; a força próton-motriz propicia a troca ATP-ADP. A adenina-nucleotídeo-translocase é inibida especificamente por atractilosídeo, glicosídeo tóxico produzido por uma espécie de cardo. Se o transporte de ADP para dentro e o de ATP para fora das mitocôndrias são inibidos, o ATP citosólico não pode ser regenerado a partir do ADP, explicando a toxicidade do atractilosídeo.

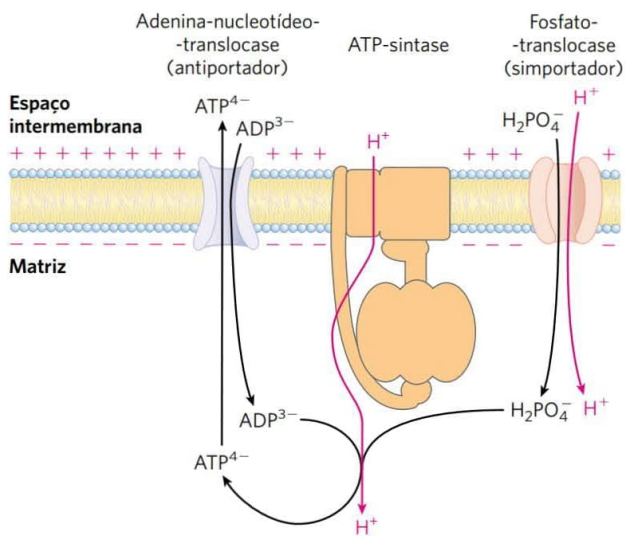


FIGURA 19-30 Adenina-nucleotídeo e fosfato-translocases. Sistemas de transporte da membrana mitocondrial interna carregam ADP e P_i para a matriz e ATP recém-sintetizado para o citosol. A adenina-nucleotídeo-translocase é um antiportador; a mesma proteína move ADP para a matriz e ATP para fora. O efeito da substituição de ATP^{4-} por ADP^{3-} na matriz é o efluxo líquido de uma carga negativa, o que é favorecido pela diferença de cargas através da membrana interna (lado de fora positivo). Em pH 7, o P_i está presente como HPO_4^{2-} e como H_2PO_4^- ; a fosfato-translocase é específica para H_2PO_4^- . Não há fluxo efetivo de cargas durante o simporte de H_2PO_4^- e H^+ , mas a concentração relativamente baixa de prótons na matriz favorece o movimento de H^+ para dentro. Assim, a força próton-motriz é responsável por proporcionar energia para a síntese de ATP e para o transporte de substratos (ADP e P_i) para dentro e do produto (ATP) para fora da matriz mitocondrial. Todos esses três sistemas de transporte podem ser isolados como um único complexo ligado à membrana (ATP-sintassomo).

Um segundo sistema de transporte de membrana essencial à fosforilação oxidativa é a **fosfato-translocase**, que promove o simporte de um H_2PO_4^- e um H^+ para a matriz. Esse processo de transporte também é favorecido pelo gradiente de prótons transmembrana (Figura 19-30). Observe que o processo requer o movimento de um próton do lado P para o lado N da membrana interna, consumindo alguma energia da transferência de elétrons. Um complexo da ATP-sintase e ambas as translocases, o **ATP-sintassomo**, podem ser isolados das mitocôndrias por dissecação suave com detergentes, sugerindo que as funções dessas três proteínas são integradas muito fortemente.

ATP e ADP cruzam a membrana mitocondrial externa pelo canal aniônico dependente de voltagem (VDAC), um barril β de 19 fitas (ver Figura 11-11) com uma abertura de cerca de 27 Å de largura, que conecta o citosol e o espaço intermembrana. Cada VDAC, quando aberto, pode mover 10^5 moléculas de ATP por segundo. A abertura do canal é dependente de voltagem, como seu nome indica, e, sob certas condições, o VDAC é fechado por ATP.

PROBLEMA 19-2 Estequiometria da produção de ATP: efeito do tamanho do anel c

(a) Se a ATP-sintase de mitocôndria *bovina* tem 8 subunidades c por anel c, qual é a razão de ATP formado por NADH oxidado que você esperaria? (b) Qual é o valor predito para as mitocôndrias de *leveduras*, com 10 subunidades c por ATP-sintase? (c) Quais são os valores comparáveis para elétrons que entram na cadeia respiratória a partir do FADH_2 ?

Solução: (a) a questão solicita a determinação de quantos ATP são produzidos por NADH. Essa é outra forma de pedir para calcularmos a razão P/O, ou x , na Equação 19-11. Se o anel c tem 8 subunidades c, então uma rotação completa transferirá 8 prótons para a matriz e produzirá 3 moléculas de ATP. Todavia, esta síntese também requer o transporte de 3 P_i para dentro da matriz, ao custo de 1 próton cada, acrescentando mais 3 prótons ao número necessário. Isso leva o custo total para $(11 \text{ prótons})/(3 \text{ ATP}) = 3,7 \text{ prótons/ATP}$. O valor consensual para o número de prótons bombeados para fora por par de elétrons transferidos do NADH é 10 (ver Figura 19-7). Assim, oxidar 1 NADH produz $(10 \text{ prótons})/(3,7 \text{ prótons/ATP}) = 2,7 \text{ ATP}$.

(b) Se o anel c tem 10 subunidades c, então uma rotação completa transferirá 10 prótons para a matriz e produzirá 3 moléculas de ATP. Acrescentando-se os 3 prótons para transportar os 3 P_i para dentro da matriz, o custo total para $(13 \text{ prótons})/(3 \text{ ATP}) = 4,3 \text{ prótons/ATP}$. A oxidação de 1 NADH produz $(10 \text{ prótons})/(4,3 \text{ prótons/ATP}) = 2,3 \text{ ATP}$.

(c) Quando os elétrons entram na cadeia respiratória a partir do FADH_2 (na ubiquinona), apenas 6 prótons estão disponíveis para impulsionar a síntese de ATP. Isso muda os cálculos para as mitocôndrias bovinas para $(6 \text{ prótons})/(3,7 \text{ prótons/ATP}) = 1,6 \text{ ATP}$ por par de elétrons do FADH_2 . Para as mitocôndrias de leveduras, o cálculo é $(6 \text{ prótons})/(4,3 \text{ prótons/ATP}) = 1,4 \text{ ATP}$ por par de elétrons do FADH_2 .

Esses valores calculados de x ou da razão P/O definem uma faixa que inclui os valores experimentais de 2,5 ATP/NADH e 1,5 ATP/ FADH_2 , e, portanto, esses valores serão usados ao longo deste livro.

Sistemas de lançadeiras conduzem indiretamente NADH citosólico para as mitocôndrias para oxidação

A NADH-desidrogenase da membrana mitocondrial interna de células animais pode aceitar elétrons somente do NADH na matriz. Considerando-se que a membrana interna não é permeável a NADH, como o NADH gerado pela glicólise no citosol pode ser reoxidado a NAD^+ pelo O_2 usando a cadeia respiratória? Sistemas especiais de lançadeiras carregam equivalentes redutores do NADH citosólico para as mitocôndrias por uma via indireta. A lançadeira de NADH mais conhecida, que funciona em mitocôndrias de fígado, rim e coração, é a **lançadeira do malato-aspartato (Figura 19-31)**. Os equivalentes redutores do NADH citosólico são primeiro transferidos ao oxalacetato citosólico para produzir malato, em uma reação catalisada pela malato-desidrogenase citosólica. O malato então formado passa através da membrana interna pelo transportador de malato- α -cetoglutarato. Dentro da matriz, os equivalentes redutores são passados ao NAD^+ pela ação da malato-desidrogenase da matriz, formando NADH; esse NADH pode passar elétrons diretamente à cadeia respiratória. Cerca de 2,5 moléculas de ATP são geradas à medida que esse par de elétrons passa para o O_2 . O oxalacetato citosólico precisa ser regenerado por reações de transaminação e atividade de transportadores de membrana para iniciar outro ciclo da lançadeira.

O músculo esquelético e o encéfalo usam uma lançadeira de NADH diferente, a **lançadeira do glicerol-3-fosfato (Figura 19-32)**. Ela difere da lançadeira do malato-aspartato por entregar os equivalentes redutores do NADH via FAD (na reação da glicerol-3-fosfato-desidrogenase) para a ubiquinona e, então, para o complexo III, não o complexo I (Figura 19-15), proporcionando energia suficiente para sintetizar apenas 1,5 molécula de ATP por par de elétrons.

As mitocôndrias das plantas têm uma NADH-desidrogenase *externamente* orientada, que pode transferir elétrons diretamente do NADH citosólico para a cadeia respiratória no nível da ubiquinona. Como essa via desvia da NADH-desidrogenase do complexo I e do movimento associado de prótons, a produção de ATP a partir do NADH citosólico é menor do que aquela obtida a partir do NADH gerado na matriz (Quadro 19-2).

RESUMO 19.2 Síntese de ATP

■ O fluxo de elétrons pelos complexos I, III e IV resulta no bombeamento de prótons através da membrana mitocondrial interna, tornando a matriz alcalina em relação ao espaço intermembrana. Esse gradiente de prótons fornece a energia (na forma de força próton-motriz) para a síntese de ATP a partir de ADP e P_i pela ATP-sintase (complexo F_0F_1) na membrana interna.

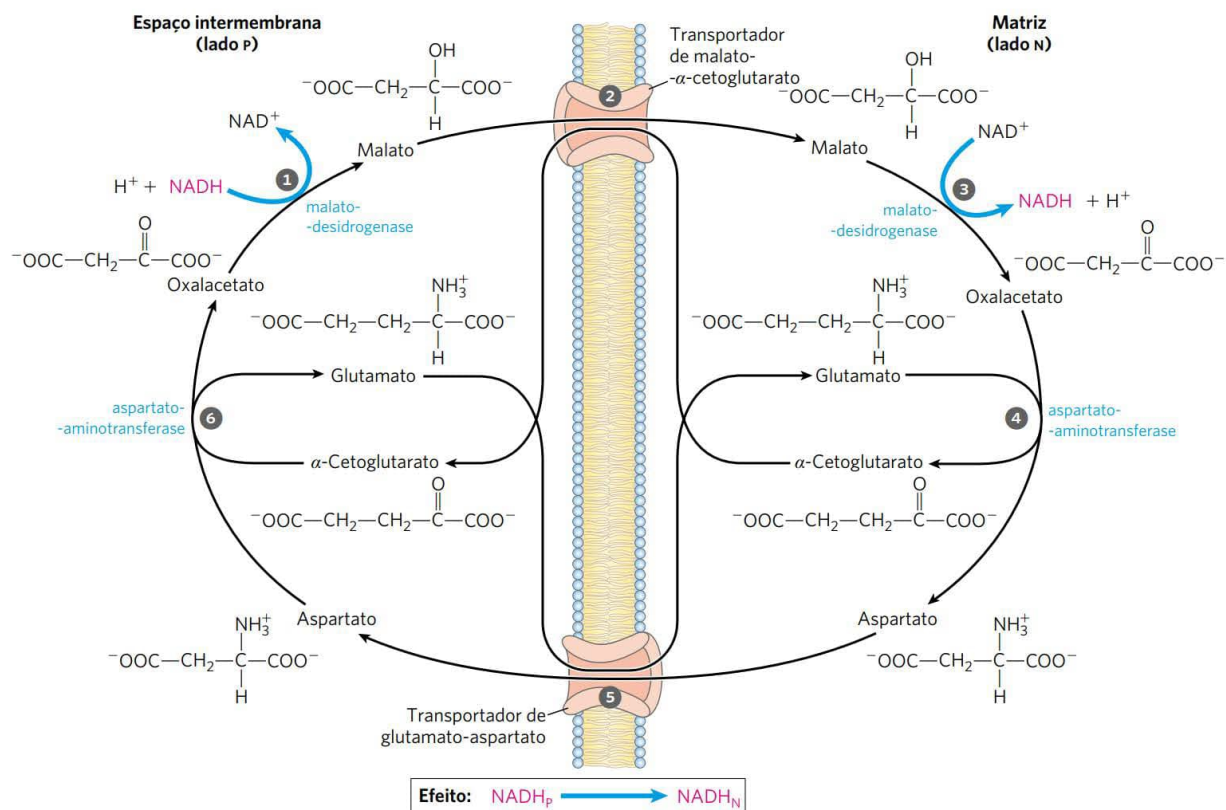
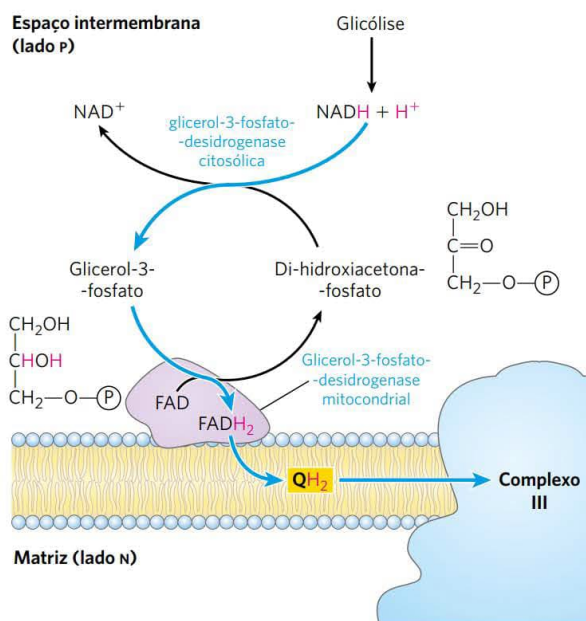


FIGURA 19-31 Lançadeira do malato-aspartato. Esta lançadeira para transporte de equivalentes redutores do NADH citosólico para dentro da matriz mitocondrial é usada em fígado, rim e coração. ❶ O NADH no citosol entra no espaço intermembrana por aberturas na membrana externa (porinas), então passa dois equivalentes redutores ao oxalacetato, produzindo malato. ❷ O malato cruza a membrana interna via transportador de malato- α -cetoglutarato. ❸ Na matriz, o malato passa dois equivalentes redutores ao NAD^+ , e o NADH resultante é oxidado pela cadeia respiratória; o oxalacetato formado a partir do malato não pode passar diretamente para o citosol. ❹ O oxalacetato é primeiro transaminado a aspartato, e ❺ este pode sair via transportador glutamato-aspartato. ❻ O oxalacetato é regenerado no citosol, completando o ciclo, e o glutamato produzido na mesma reação entra na matriz via transportador glutamato-aspartato.



- A ATP-sintase realiza a “catálise rotacional”, em que o fluxo de prótons por F_o faz cada um dos três sítios de ligação de nucleotídeos em F_1 oscilar entre as conformações (ADP+ P_i)-ligado, ATP-ligado e vazio.
- A formação de ATP na enzima requer pouca energia; o papel da força próton-motriz é deslocar o ATP de seu sítio de ligação na sintase.
- A razão entre ATP sintetizado por $\frac{1}{2}\text{O}_2$ reduzido a H_2O (a razão P/O) é de cerca de 2,5 quando os elétrons entram na cadeia respiratória no complexo I, e 1,5 quando

FIGURA 19-32 Lançadeira do glicerol-3-fosfato. Esta forma alternativa de mover equivalentes redutores do citosol para a cadeia respiratória opera no músculo esquelético e no encéfalo. No citosol, di-hidroxiacetona-fosfato aceita dois equivalentes redutores do NADH em uma reação catalisada pela glicerol-3-fosfato-desidrogenase citosólica. Uma isoenzima da glicerol-3-fosfato-desidrogenase ligada à face externa da membrana interna transfere, então, dois equivalentes redutores do glicerol-3-fosfato no espaço intermembrana para a ubiquinona. Observe que essa transferência não envolve sistemas de transporte de membrana.

os elétrons entram na ubiquinona. Essa razão pode variar um pouco em diferentes organismos, dependendo do número de subunidades c no complexo F_0 .

- A energia conservada em um gradiente de prótons pode propiciar o transporte de solutos contra o gradiente através da membrana.
- A membrana mitocondrial interna é impermeável a NADH e NAD^+ , mas equivalentes de NADH são movidos do citosol para a matriz por duas lançadeiras. Equivalentes de NADH deslocados para dentro pela lançadeira do malato-aspartato entram na cadeia respiratória no complexo I e produzem uma razão P/O de 2,5; aqueles movimentados para dentro pela lançadeira do glicerol-3-fosfato entram via ubiquinona e geram uma razão P/O de 1,5.

19.3 Regulação da fosforilação oxidativa

A fosforilação oxidativa produz a maior parte do ATP produzido em células aeróbicas. A oxidação completa de uma molécula de glicose a CO_2 produz 30 ou 32 ATP (Tabela 19-5). Em comparação, a glicólise sob condições anaeróbicas (fermentação láctica) gera apenas dois ATP por glicose. Claramente, a evolução da fosforilação oxidativa proporcionou um grande aumento na eficiência energética do catabolismo. A oxidação completa até CO_2 do derivado do palmitato (16:0) ligado à coenzima A, que também ocorre na matriz mitocondrial, produz 108 ATP por palmitoil-CoA (ver Tabela 17-1). Um cálculo similar pode ser feito para a produção de ATP a partir da oxidação de cada um dos aminoácidos (Capítulo 18). Portanto, as vias oxidativas aeróbicas que resultam na transferência de elétrons ao O_2 acompanhada da fosforilação oxidativa são responsáveis pela grande maioria do ATP produzido no catabolismo, de forma que é absolutamente essencial a regulação da produção de ATP pela fosforilação oxidativa, para se ajustar às necessidades celulares flutuantes da demanda por ATP.

A fosforilação oxidativa é regulada pelas necessidades celulares de energia

A taxa da respiração (consumo de O_2) nas mitocôndrias é fortemente regulada, sendo limitada pela disponibilidade de ADP como substrato para a fosforilação. A dependência

da taxa de consumo de O_2 em relação à disponibilidade do aceptor de P_i ADP (Figura 19-20b), o **controle pelo aceptor** da respiração, pode ser notável. Em alguns tecidos animais, a **razão do controle pelo aceptor**, a razão entre a taxa máxima de consumo de O_2 induzida por ADP e a taxa basal na ausência de ADP, é de pelo menos 10.

A concentração intracelular de ADP é uma medida do estado energético das células. Outra medida relacionada, derivada da lei de ação das massas, é a **razão das massas** do sistema ATP-ADP, $[ATP]/([ADP][P_i])$. Em geral, essa razão é muito alta, de forma que o sistema ATP-ADP está quase totalmente fosforilado. Quando aumenta a taxa de algum processo que requer energia (p. ex., a síntese proteica), também aumenta a taxa de quebra de ATP em ADP e P_i , baixando a razão das massas. Com mais ADP disponível para a fosforilação oxidativa, a taxa da respiração aumenta, causando a regeneração do ATP. Isso continua até que a razão das massas retorne ao seu nível normal alto, no qual a respiração diminui novamente. A velocidade de oxidação de combustíveis celulares é regulada com tal sensibilidade e precisão que a razão $[ATP]/([ADP][P_i])$ flutua apenas levemente na maioria dos tecidos, mesmo durante variações extremas na demanda de energia. Em resumo, o ATP é formado exatamente tão rápido quanto é usado nas atividades celulares que requerem energia.

Uma proteína inibitória impede a hidrólise de ATP durante a hipoxia

A ATP-sintase já foi apresentada como uma bomba de prótons movida a ATP (ver Figura 11-37), catalisando o reverso da síntese de ATP. Quando uma célula está hipóxica (desprovida de oxigênio), como em um infarto do miocárdio ou acidente vascular cerebral, a transferência de elétrons para o oxigênio fica mais lenta, da mesma forma que o bombeamento de prótons. A força próton-motriz em seguida colapsa. Nessas condições, a ATP-sintase poderia operar ao contrário, hidrolisando o ATP produzido pela glicólise para bombear prótons para fora e causando uma queda desastrosa nos níveis de ATP. Isso é impedido por um inibidor proteico pequeno (84 aminoácidos), IF_1 , que se liga simultaneamente a duas moléculas de ATP-sintase, inibindo sua atividade ATPásica (**Figura 19-33**). IF_1 é inibitório apenas na sua forma dimérica, a qual é favorecida em pH menor

TABELA 19-5 Produção de ATP a partir da oxidação completa da glicose

Processo	Produto direto	ATP final
Glicólise	2 NADH (citossólico) 2 ATP	3 ou 5 ^a 2
Oxidação do piruvato (dois por glicose)	2 NADH (matriz mitocondrial)	5
Oxidação da acetil-CoA no ciclo do ácido cítrico (duas por molécula de glicose)	6 NADH (matriz mitocondrial) 2 $FADH_2$ 2 ATP ou 2 GTP	15 3 2
Produção total por glicose		30 ou 32

^aSe a lançadeira do malato/aspartato for utilizada para transferir equivalentes redutores para a mitocôndria, o rendimento é de 5 ATP. Se for utilizada a lançadeira do glicerol-3-fosfato, o rendimento é de 3 ATP.

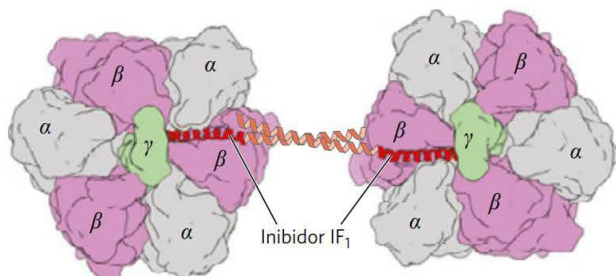


FIGURA 19-33 Estrutura da F_1 -ATPase bovina em um complexo com sua proteína regulatória IF_1 . Duas moléculas de F_1 são observadas aqui a partir do lado P , como na Figura 19-25c. O inibidor IF_1 (em vermelho) liga-se à interface $\alpha\beta$ das subunidades na conformação difosfato (ADP) (α -ADP e β -ADP), congelando os dois complexos F_1 e, assim, bloqueando a hidrólise de ATP (e sua síntese). (As partes de IF_1 , que não apresentaram resolução no cristal de F_1 são mostradas em vermelho-claro, na forma em que ocorrem em cristais de IF_1 isolados.) Este complexo é estável somente no pH citosólico baixo característico de células que estão produzindo ATP pela glicólise; quando o metabolismo aeróbico recomeça, o pH citosólico aumenta, o inibidor é desestabilizado e a ATP-sintase se torna ativa. [Fonte: derivada de PDB ID 1OHH, E. Cabezon et al., *Nature Struct. Biol.* 10:744, 2003.]

do que 6,5. Em uma célula com baixos níveis de oxigênio, a glicólise torna-se a principal fonte de ATP, e o ácido pirúvico ou láctico então formado diminui o pH no citosol e na matriz mitocondrial. Isso favorece a dimerização de IF_1 , levando a uma inibição da atividade ATPásica da ATP-sintase e, portanto, impedindo a hidrólise desnecessária de ATP. Quando o metabolismo aeróbico recomeça, a produção de ácido pirúvico diminui, o pH do citosol aumenta, o dímero IF_1 é desestabilizado e a inibição da ATP-sintase é removida. IF_1 é uma proteína desorganizada intrinsecamente (p. 138); ela adquire uma conformação favorável apenas ao interagir com a ATP-sintase.

A hipoxia leva à produção de ERO e a várias respostas adaptativas

Em células hipóxicas, existe um desequilíbrio entre a chegada de elétrons a partir da oxidação de combustíveis celulares na matriz mitocondrial e a transferência de elétrons para o oxigênio molecular, levando a uma maior formação de espécies reativas de oxigênio. Além do sistema da glutatona-peroxidase (Figura 19-18), as células têm outras duas linhas de defesa contra as ERO (**Figura 19-34**). Uma

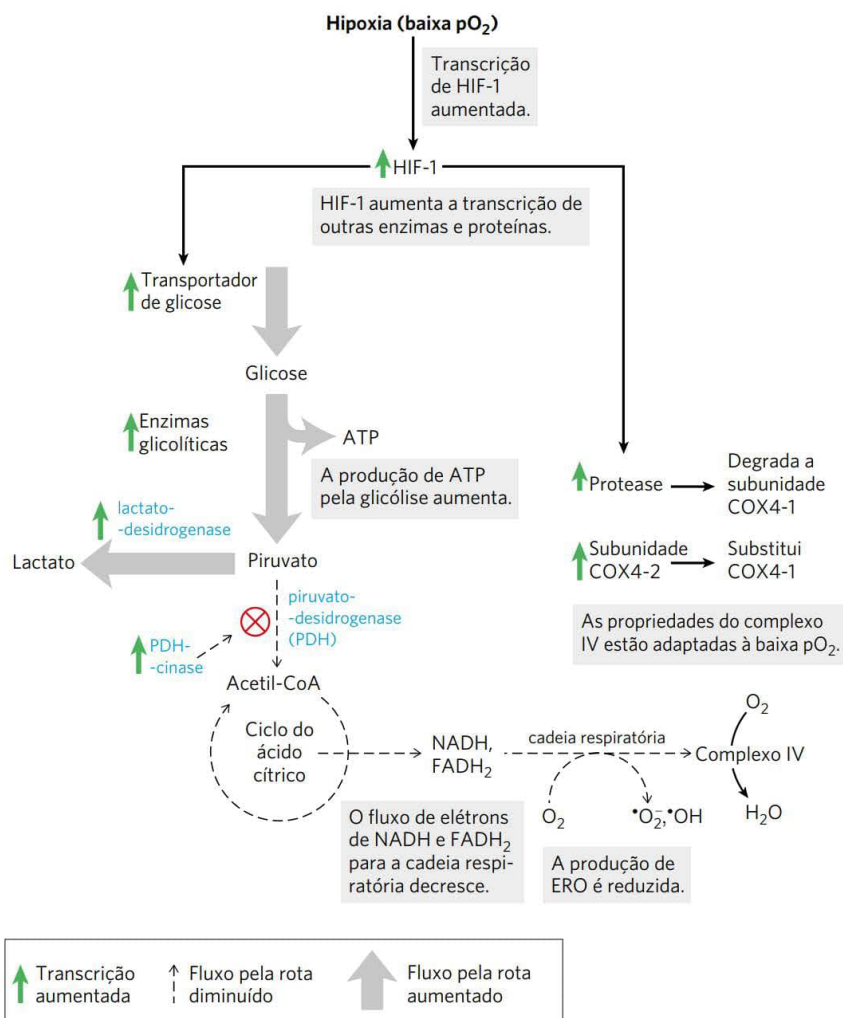


FIGURA 19-34 Regulação da expressão gênica pelo fator induzível por hipoxia 1 (HIF-1) para reduzir a formação de ERO.

Sob condições de pouco oxigênio (hipoxia), HIF-1 é sintetizado em quantidades maiores e age como fator de transcrição, aumentando a síntese do transportador de glicose, de enzimas glicolíticas, da piruvato-desidrogenase-cinase (PDH-cinase), da lactato-desidrogenase, de uma protease que degrada a subunidade COX4-1 da citocromo-oxidase e da subunidade COX4-2 da citocromo-oxidase. Estas mudanças se opõem à formação de ERO, por diminuir o suprimento de NADH e $FADH_2$ e por tornarem a citocromo-oxidase do complexo IV mais efetiva. [Fonte: informação obtida de D. A. Harris, *Bioenergetics at a Glance*, p. 36, Blackwell Science, 1995.]

é a regulação da piruvato-desidrogenase (PDH), a enzima que fornece acetil-CoA ao ciclo do ácido cítrico (Capítulo 16). Sob condições hipóxicas, a PDH-cinase fosforila a PDH mitocondrial, inativando-a e reduzindo o fornecimento de FADH_2 e NADH do ciclo do ácido cítrico para a cadeia respiratória. A segunda maneira de impedir a formação de ERO é a substituição de uma subunidade do complexo IV, conhecida como COX4-1, por outra subunidade, COX4-2, que é mais bem ajustada a condições hipóxicas. Com COX4-1, as propriedades catalíticas do complexo IV são ótimas para a respiração em concentrações normais de oxigênio; com COX4-2, o complexo IV é otimizado para operar sob condições hipóxicas.

As mudanças na atividade da PDH e no conteúdo de COX4-2 do complexo IV são ambas mediadas por HIF-1, o fator induzível por hipoxia. O HIF-1 (outra proteína desorganizada intrinsecamente) acumula-se em células hipóxicas e, atuando como fator de transcrição, desencadeia um aumento na síntese de PDH-cinase, COX4-2 e uma protease que degrada COX4-1. O HIF-1 é um regulador-chave da homeostasia de O_2 . Lembre-se de que ele também medeia as alterações no transporte de glicose e nas enzimas glicolíticas que produzem o efeito Warburg, quando há dependência da glicólise (e não da respiração mitocondrial) para a produção de ATP, mesmo na presença de oxigênio em quantidade suficiente (ver Quadro 14-1).



Quando esses mecanismos para lidar com as ERO são insuficientes, devido a mutações genéticas que afetam uma dessas proteínas protetoras ou sob condições de taxas muito altas de produção de ERO, a função mitocondrial fica comprometida. Acredita-se que o dano mitocondrial esteja envolvido no envelhecimento, no colapso cardíaco, em certos casos raros de diabetes (descritos a seguir) e em várias doenças genéticas de herança materna que afetam o sistema nervoso. ■

As vias produtoras de ATP são reguladas de modo coordenado

As principais vias catabólicas têm mecanismos regulatórios coordenados e sobrepostos, que lhes permitem funcionar juntas, em uma forma econômica e autorregulada, para produzir ATP e precursores biossintéticos. As concentrações relativas de ATP e ADP controlam não somente as taxas de transferência de elétrons e a fosforilação oxidativa, mas também as velocidades do ciclo do ácido cítrico, da oxidação do piruvato e da glicólise (**Figura 19-35**). Sempre que o consumo de ATP aumenta, as velocidades da cadeia de transporte de elétrons e da fosforilação oxidativa aumentam. De modo simultâneo, a velocidade de oxidação do piruvato pelo ciclo do ácido cítrico aumenta, elevando o fluxo de elétrons na cadeia respiratória. Esses eventos podem, por sua vez, evocar um aumento na velocidade da glicólise, aumentando a velocidade de formação de piruvato. Quando a conversão de ADP em ATP reduz a concentração de ADP, o controle pelo aceptor diminui a transferência de elétrons e, assim, a fosforilação oxidativa. A glicólise e o ciclo do ácido cítrico também têm sua velocidade reduzida, uma vez que o ATP é um inibidor alostérico da enzima glicolítica fosfofrutocinase 1 (ver Figura 15-16) e da piruvato-desidrogenase (ver Figura 16-19).

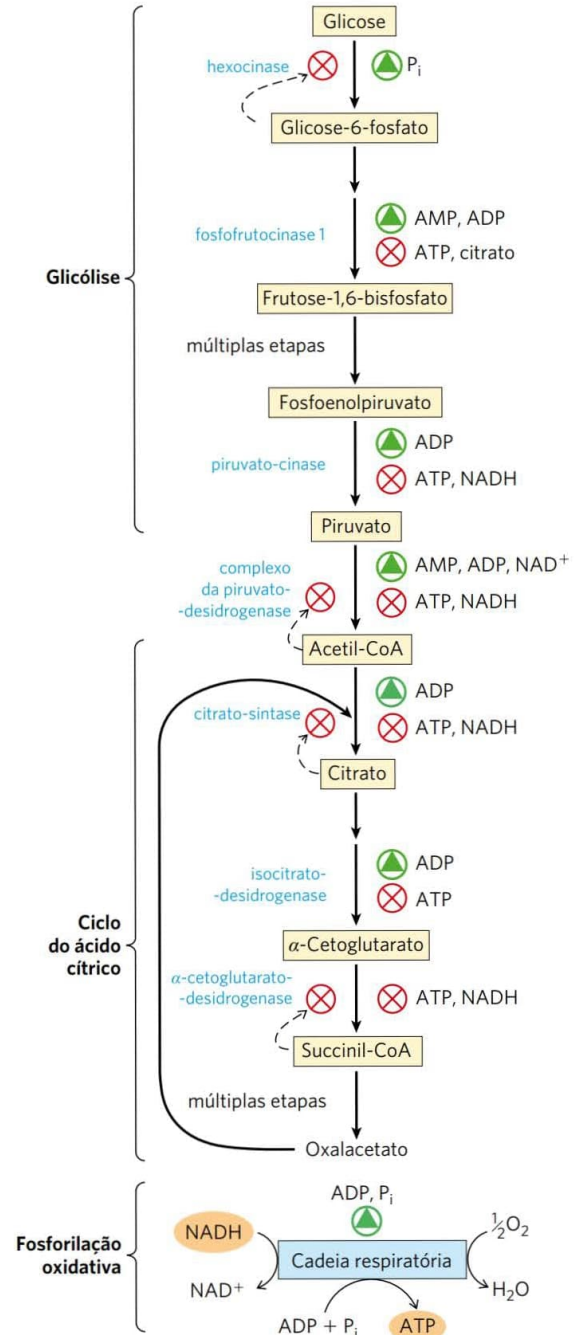


FIGURA 19-35 Regulação das vias que produzem ATP. Este diagrama mostra a regulação interconectada da glicólise, da oxidação do piruvato, do ciclo do ácido cítrico e da fosforilação oxidativa pelas concentrações relativas de ATP, ADP, AMP e por NADH . Alta $[\text{ATP}]$ (ou baixa $[\text{ADP}]$ e $[\text{AMP}]$) produz baixas velocidades de glicólise, da oxidação do piruvato, da oxidação do acetato via ciclo do ácido cítrico e da fosforilação oxidativa. Todas as quatro vias são aceleradas quando o uso de ATP e a formação de ADP, AMP e P_i aumentam. A capacidade do citrato de inibir tanto a glicólise quanto o ciclo do ácido cítrico reforça a ação do sistema de nucleotídeos da adenina. Além disso, níveis aumentados de NADH e de acetil-CoA também inibem a oxidação de piruvato a acetil-CoA, e uma alta razão $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+]$ inibe as reações das desidrogenases do ciclo do ácido cítrico (ver Figura 16-19).

A fosfofrutocinase 1 também é inibida por citrato, o primeiro intermediário do ciclo do ácido cítrico. Quando o ciclo estiver em “ponto morto”, o citrato acumula-se dentro das mitocôndrias, sendo então transportado para o citosol. Quando tanto as concentrações de ATP quanto de citrato aumentam, eles produzem um efeito alostérico negativo em conjunto sobre a fosfofrutocinase 1, que é maior do que a soma dos seus efeitos individuais, reduzindo a glicólise.

RESUMO 19.3 Regulação da fosforilação oxidativa

- A fosforilação oxidativa é regulada pelas demandas energéticas celulares. A $[ADP]$ intracelular e a razão das massas $[ATP]/([ADP][P_i])$ são medidas do estado energético de uma célula.
- Em células hipóxicas (desprovidas de oxigênio), um inibidor proteico bloqueia a hidrólise de ATP pela atividade reversa da ATP-sintase, impedindo uma queda drástica na $[ATP]$.
- As respostas adaptativas à hipóxia, mediadas por HIF-1, reduzem a transferência de elétrons para a cadeia respiratória e modificam o complexo IV para que ele atue de maneira mais eficiente sob condições de baixo oxigênio.
- As concentrações de ATP e ADP estabelecem a velocidade de transporte de elétrons pela cadeia respiratória por uma série de controles interconectados sobre a respiração, a glicólise e o ciclo do ácido cítrico.

19.4 Mitocôndrias na termogênese, na síntese de esteroides e na apoptose

Embora a produção de ATP seja o papel central da mitocôndria, esta organela tem outras funções que, em tecidos específicos ou sob condições específicas, também são essenciais. No tecido adiposo, as mitocôndrias geram calor para proteger órgãos vitais da baixa temperatura do ambiente. Nas glândulas suprarrenais e nas gônadas, as mitocôndrias são o local de síntese de hormônios esteroides. Além disso, na maioria dos tecidos elas são participantes-chave na apoptose (morte celular programada).

O desacoplamento em mitocôndrias do tecido adiposo marrom produz calor

Foi mencionado que a respiração fica mais lenta quando a célula está adequadamente suprida com ATP. Existe uma exceção notável e instrutiva a essa regra geral. A maioria dos mamíferos recém-nascidos, incluindo os seres humanos, tem um tipo de tecido adiposo, chamado de **tecido adiposo marrom (TAM; p. 923)**, no qual a oxidação de combustível serve não para produzir ATP, mas para gerar calor para manter o recém-nascido aquecido. Esse tecido adiposo especializado é marrom devido à presença de um grande número de mitocôndrias e, portanto, de uma alta concentração de citocromos, com grupos heme que são fortes absorvedores de luz visível.

As mitocôndrias dos adipócitos marrons são muito semelhantes às de outras células de mamíferos, exceto por terem uma proteína singular na membrana interna. A **proteína desacopladora 1 (UCP1)**, fornece uma via para os prótons retornarem à matriz sem passarem pelo complexo

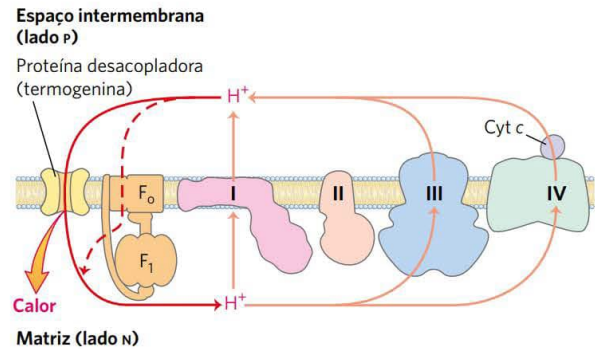


FIGURA 19-36 Geração de calor por mitocôndrias desacopladas.

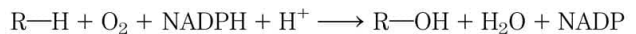
A proteína desacopladora UCP-1 nas mitocôndrias do tecido adiposo marrom, ao fornecer uma via alternativa para os prótons reentrarem na matriz mitocondrial, faz a energia conservada pelo bombeamento de prótons ser dissipada como calor.

F_0F_1 (Figura 19-36). Como resultado desse curto-circuito de prótons, a energia de oxidação não é conservada pela formação de ATP, mas dissipada como calor, o que contribui para manter a temperatura corporal (ver Figura 23-16).

Os animais que hibernam também dependem da atividade de mitocôndrias desacopladas no TAM para gerar calor durante seus longos períodos adormecidos (ver Quadro 17-1). Retornaremos ao papel da UCP-1 quando for discutida a regulação da massa corporal no Capítulo 23 (pp. 940-941).

Monoxigenases P-450 mitocondriais catalisam hidroxilações de esteroides

As mitocôndrias são o sítio das reações biossintéticas que produzem os hormônios esteroides, incluindo os hormônios sexuais, os glicocorticoides, os mineralocorticoides e o hormônio vitamina D. Esses compostos são sintetizados a partir do colesterol ou de um esteroide relacionado, em uma série de hidroxilações catalisadas por enzimas da família **citocromo P-450** (ver Quadro 21-1), todas tendo um grupo heme crítico (sua absorção a 450 nm dá o nome à família). Nas reações de hidroxilação, um átomo do oxigênio molecular é incorporado ao substrato e o segundo é reduzido a H_2O , o que significa que as enzimas citocromo P-450 são monoxigenases:



Nessa reação, duas espécies são oxidadas: NADPH e $R-H$.

Existem dúzias de enzimas P-450, todas localizadas na membrana mitocondrial interna, com seus sítios catalíticos expostos à matriz. As células esteroidogênicas estão repletas de mitocôndrias especializadas na síntese de esteroides; as mitocôndrias geralmente são maiores do que aquelas em outros tecidos e têm membranas internas mais extensas e altamente enroladas sobre si mesmas (Figura 19-37).

A via do fluxo de elétrons no sistema P-450 mitocondrial é complexa, envolvendo uma flavoproteína e uma proteína ferro-enxofre, que carregam elétrons do NADPH ao heme P-450 (Figura 19-38). Todas as enzimas P-450 têm um heme que interage com o O_2 e um sítio de ligação ao substrato que confere especificidade.

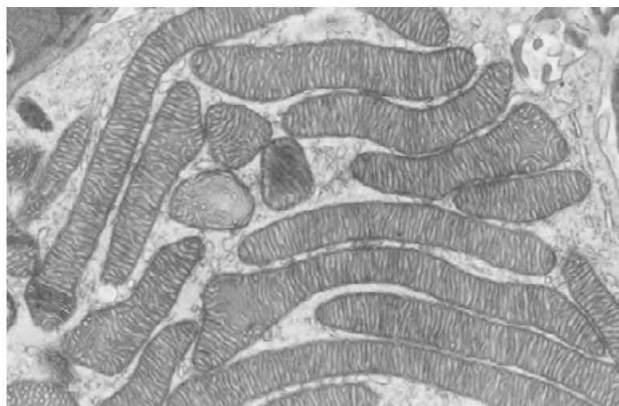


FIGURA 19-37 Mitocôndrias da glândula suprarrenal, especializadas na síntese de esteroides. Conforme se vê nesta micrografia eletrônica de uma fina secção da glândula suprarrenal, as mitocôndrias são profundas e têm cristas extensas, proporcionando uma grande superfície para as enzimas P-450 da membrana interna. [Fonte: Don Fawcett/Science Source.]

Outra grande família de enzimas P-450 é encontrada no retículo endoplasmático (RE) de hepatócitos. Essas enzimas catalisam reações semelhantes às reações P-450 mitocondriais, mas seus substratos incluem uma ampla variedade de compostos hidrofóbicos, muitos dos quais são **xenobióticos** – compostos não encontrados na natureza, mas sintetizados industrialmente. As enzimas P-450 do RE têm especificidades muito amplas e que se sobrepõem. A hidroxilação dos compostos hidrofóbicos os torna mais solúveis em água e elas podem, então, ser liberadas pelos rins e excretadas na urina. Entre os substratos para estas oxigenases P-450 estão muitos medicamentos comumente utilizados. O metabolismo pelas enzimas P-450 limita o tempo de vida dos fármacos na corrente sanguínea e seus efeitos terapêuticos. Os seres humanos diferem em seus complementos genéticos de enzimas P-450 no RE e na extensão com a qual certas enzimas P-450 foram induzidas, como em um histórico de ingestão de álcool. Em princípio, portanto, a genética e a história pessoal de um indivíduo podem ser levadas em conta para determinações de doses terapêuticas de fármacos. Na prática, esse ajuste preciso de doses não é ainda factível economicamente, mas pode vir a ser. ■

As mitocôndrias são de importância central para o início da apoptose

A **apoptose**, também chamada de **morte celular programada**, é um processo no qual células individuais morrem para o bem do organismo (p. ex., no transcorrer do desen-

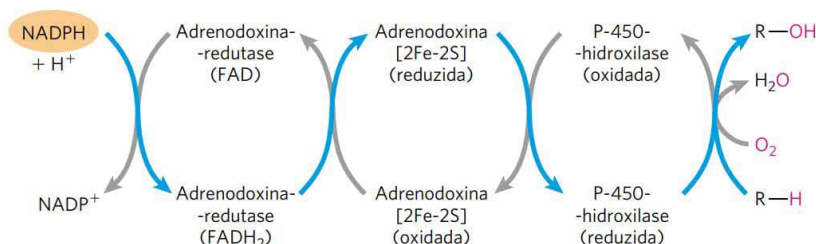
volvimento embrionário normal), e o organismo conserva os componentes moleculares da célula (aminoácidos, nucleotídeos e assim por diante). A apoptose pode ser desencadeada por um sinal externo, atuando em um receptor da membrana plasmática, ou por eventos internos, como lesão de DNA, infecção viral, estresse oxidativo pelo acúmulo de ERO ou outro estresse, como choque térmico.

As mitocôndrias desempenham um papel fundamental em desencadear a apoptose. Quando um estressor fornece o sinal para a morte da célula, a consequência inicial é um aumento na permeabilidade da membrana mitocondrial externa, permitindo que o citocromo *c* escape do espaço intermembrana para o citosol (**Figura 19-39**). O aumento da permeabilidade é devido à abertura do **complexo do poro de transição de permeabilidade (CPTP)**, proteína de múltiplas subunidades na membrana externa; sua abertura e seu fechamento são afetados por várias proteínas que estimulam ou suprimem a apoptose. Quando liberado no citosol, o citocromo *c* interage com monômeros da proteína **protease fator 1 de ativação de apoptose (Apaf-1)**, do inglês, *apoptosis protease activating factor-1*, causando a formação de um **apoptossomo** composto por sete moléculas de Apaf-1 e sete moléculas de citocromo *c*. O apoptossomo proporciona a plataforma sobre a qual a pró-enzima procaspase 9 é ativada a caspase 9, membro de uma família de proteases altamente específicas, as **caspases**, envolvidas na apoptose. Todas apresentam um resíduo *Cys* crucial em seus sítios ativos, e todas clivam proteínas apenas no lado carboxiterminal dos resíduos de *Asp*, por isso o nome “caspases”. A caspase 9 ativada inicia uma cascata de ativações proteolíticas, com uma caspase ativando uma segunda, que, por sua vez, ativa uma terceira, e assim por diante (ver Figura 12-40). Observe que esse papel do citocromo *c* na apoptose é um caso claro de “jornada dupla”, em que uma proteína desempenha dois papéis muito diferentes na célula (ver Quadro 16-1).

RESUMO 19.4 Mitocôndrias na termogênese, na síntese de esteroides e na apoptose

- No tecido adiposo marrom de recém-nascidos, a transferência de elétrons está desacoplada da síntese de ATP, e a energia da oxidação de combustível é dissipada como calor. Os animais em hibernação usam essa estratégia para evitar o congelamento.
- As reações de hidroxilação na síntese de hormônios esteroides em tecidos esteroidogênicos (glândula suprarrenal, gônadas, fígado e rim) ocorrem em mitocôndrias especializadas.

FIGURA 19-38 Via do fluxo de elétrons nas reações do citocromo P-450 mitocondrial na glândula suprarrenal. Dois elétrons são transferidos do NADPH à flavoproteína contendo FAD, adrenodoxina-redutase, que passa os elétrons, um de cada vez, à adrenodoxina, uma pequena proteína solúvel contendo 2Fe-2S. A adrenodoxina passa elétrons individuais à citocromo P-450-hidroxilase, que interage diretamente com o O_2 e o substrato (R-H) para formar os produtos H_2O e R-OH.



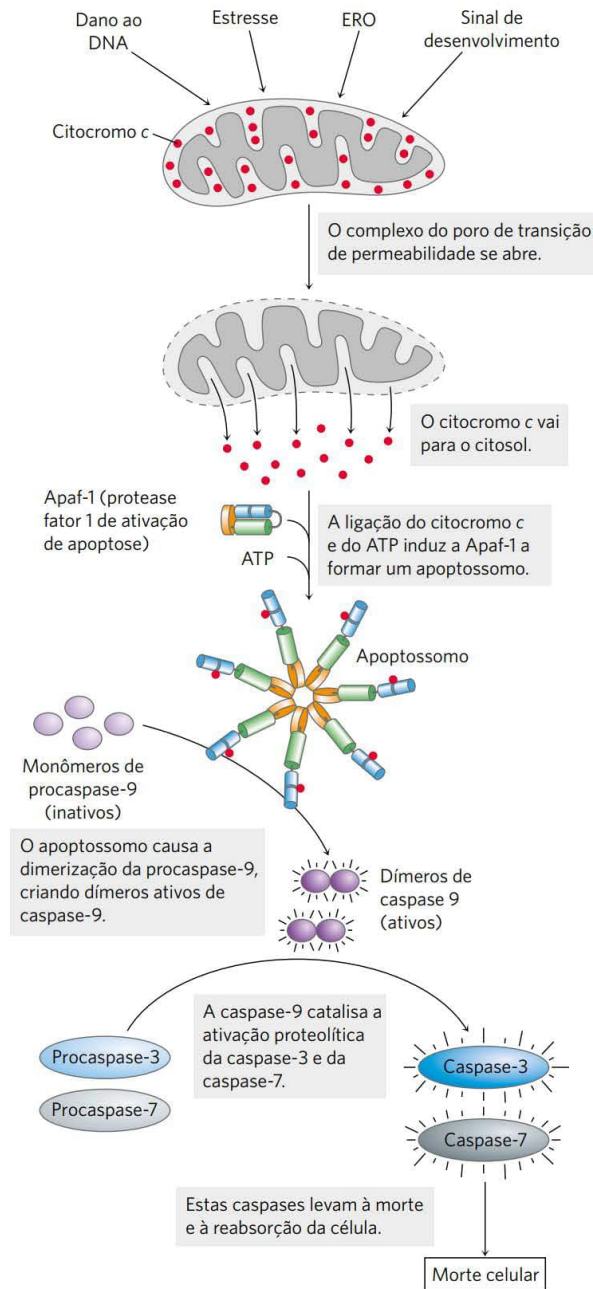


FIGURA 19-39 O papel do citocromo c na apoptose. O citocromo c é uma proteína mitocondrial pequena e solúvel, localizada no espaço intermembrana, que carrega elétrons entre o complexo III e o complexo IV durante a respiração. Em um papel completamente separado, como aqui esboçado, ele age como um gatilho para a apoptose, estimulando a ativação de uma família de proteases, chamadas de caspases. [Fonte: informação obtida de S. J. Riedl e G. S. Salvesen, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8:409, 2007, Fig. 3.]

■ O citocromo c mitocondrial liberado no citosol participa da ativação da caspase 9, uma das proteases envolvidas na apoptose.

19.5 Genes mitocondriais: suas origens e efeitos das mutações

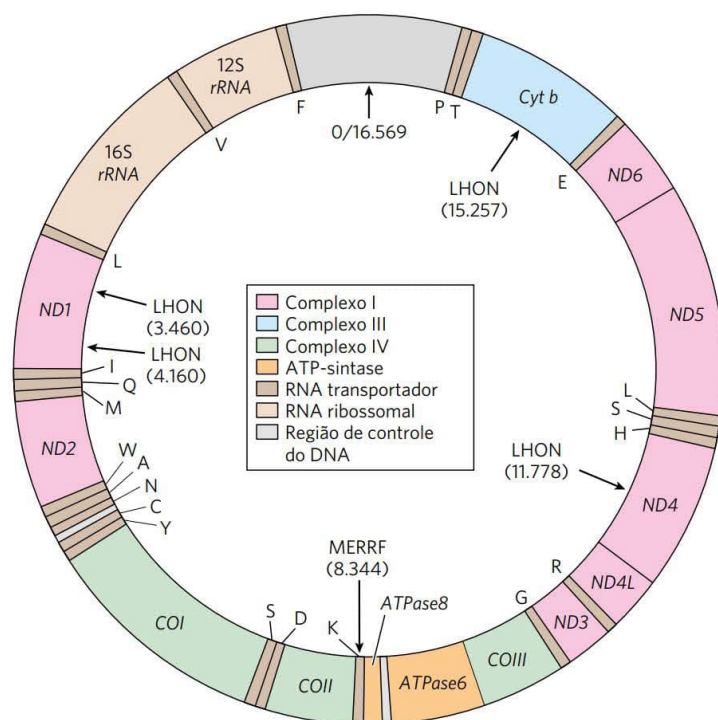
As mitocôndrias contêm seus próprios genomas, uma molécula circular de DNA dupla-fita (mtDNA). Cada uma das centenas ou milhares de mitocôndrias em uma célula típica tem cerca de cinco cópias desse genoma. O cromossomo mitocondrial humano (**Figura 19-40**) contém 37 genes (16.569 pb), incluindo 13 que codificam subunidades de proteínas da cadeia respiratória (Tabela 19-6); os demais genes codificam moléculas de rRNA e tRNA, essenciais para a maquinaria de síntese de proteínas das mitocôndrias. Para sintetizar essas 13 subunidades proteicas, as mitocôndrias têm seus próprios ribossomos, distintos daqueles do citoplasma. A grande maioria das proteínas mitocondriais – cerca de 1.100 tipos diferentes – é codificada por genes nucleares, sintetizada nos ribossomos citoplasmáticos e, então, importada e organizada nas mitocôndrias (Capítulo 27).

As mitocôndrias evoluíram a partir de bactérias endossimbióticas

A existência de DNA mitocondrial, ribossomos e tRNA dá suporte à teoria da origem endossimbiótica das mitocôndrias (ver Figura 1-40), que sustenta que os primeiros organismos capazes de metabolismo aeróbico, incluindo a produção de ATP ligada à respiração, eram bactérias. Os eucariotos primitivos que viviam anaerobicamente (por fermentação) adquiriram a capacidade de realizar a fosforilação oxidativa quando estabeleceram uma relação simbiótica com bactérias que viviam em seu citosol. Depois de um longo período de evolução e do movimento de muitos genes bacterianos para o núcleo do hospedeiro eucariótico,

TABELA 19-6 Proteínas respiratórias codificadas por genes mitocondriais em seres humanos

Complexo	Número de subunidades	Número de subunidades codificadas por DNA mitocondrial
I NADH-desidrogenase	45	7
II Succinato-desidrogenase	4	0
III Ubiquinona:citocromo c-oxidorreductase	11	1
IV Citocromo-oxidase	13	3
V ATP-sintase	8	2

**FIGURA 19-40 Genes mitocondriais e mutações.**

Mapa do DNA mitocondrial humano, mostrando os genes que codificam proteínas do complexo I, a NADH-desidrogenase (ND1 a ND6); o citocromo *b* do complexo III (*Cyt b*); as subunidades da citocromo-oxidase (complexo IV) (*COI* a *COIII*); e as duas subunidades da ATP-sintase (*ATPase6* e *ATPase8*). As cores dos genes correspondem àquelas dos complexos mostrados na Figura 19-7. Também estão incluídos aqui os genes para os RNA ribossomais (*rRNA*) e para alguns RNA transportadores específicos de mitocôndria; a especificidade do tRNA é indicada pelos códigos de uma letra para os aminoácidos. As setas indicam as posições das mutações que causam a neuropatia óptica hereditária de Leber (LHON) e a doença da epilepsia mioclônica e fibra vermelha rota (MERRF). Os números dentro dos parênteses indicam a posição dos nucleotídeos alterados (o nucleotídeo 1 está no topo do círculo e a numeração prossegue no sentido anti-horário). [Fonte: informação obtida de M. A. Morris, *J. Clin. Neuroophthalmol.* 10:159, 1990.]

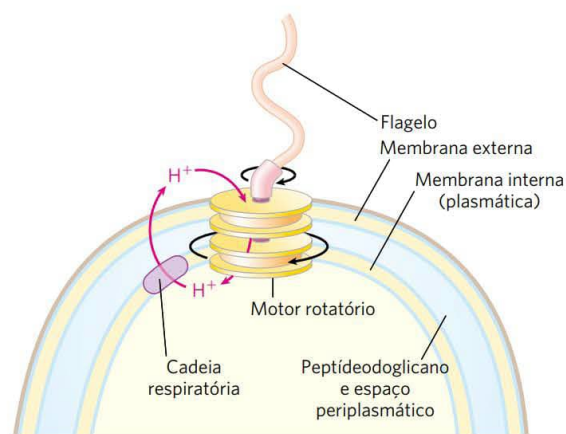
co, as bactérias endossimbióticas, ao final, tornaram-se as mitocôndrias.

Essa hipótese assume que bactérias primitivas de vida livre tinham a maquinaria enzimática para realizar a fosforilação oxidativa e prevê que bactérias modernas descendentes delas devem apresentar cadeias respiratórias muito similares àquelas dos eucariotos modernos. Elas têm. As bactérias aeróbicas realizam a transferência de elétrons associada ao NAD de substratos para o O_2 , acoplada à fosforilação de ADP citosólico. As desidrogenases estão localizadas no citosol bacteriano, e a cadeia respiratória, na membrana plasmática. Os carreadores de elétrons transportam prótons para fora através da membrana plasmática, à medida que elétrons são transferidos para o O_2 . As bactérias, como a *Escherichia coli*, têm complexos F_oF_1 em suas membranas plasmáticas; a porção F_1 projeta-se para o citosol e catalisa a síntese de ATP a partir de ADP e P_i , à medida que os prótons fluem de volta para a célula através do canal de prótons de F_o .

A extrusão de prótons através da membrana plasmática bacteriana associada à respiração também fornece a força propulsora para outros processos. Certos sistemas de transporte bacterianos permitem a absorção de nutrientes extracelulares (p. ex., lactose) contra um gradiente de concentração, em simporte com prótons (ver Figura 11-39). E o movimento rotatório de flagelos bacterianos é proporcionado por “turbinas de prótons”, motores moleculares de rotação impulsionados não por ATP, mas diretamente pelo potencial eletroquímico transmembrana gerado pelo bombeamento de prótons associado à respiração (Figura 19-41). Parece provável que o mecanismo quimiosmótico tenha evoluído cedo, antes do surgimento dos eucariotos.

Mutações em DNA mitocondrial acumulam-se ao longo de toda a vida do organismo

A cadeia respiratória é o principal produtor de espécies reativas de oxigênio na célula, de forma que os conteúdos mitocondriais, incluindo o genoma mitocondrial, sofrem a maior exposição e o maior dano por ERO. Além disso, o sistema mitocondrial de replicação de DNA é menos eficiente do que o sistema nuclear em corrigir erros feitos durante a

**FIGURA 19-41 Rotação de flagelos bacterianos pela força próton-motriz.**

O eixo e os anéis na base do flagelo constituem um motor rotatório que tem sido chamado de “turбина de prótons”. Os prótons ejetados pela transferência de elétrons fluem de volta para a célula pela turbina, causando a rotação do eixo do flagelo. Este movimento difere fundamentalmente do movimento de músculos e de flagelos e cílios de eucariotos, para os quais a hidrólise de ATP é a fonte de energia.

replicação e em reparar dano ao DNA. Como consequência desses dois fatores, defeitos no mtDNA acumulam-se ao longo do tempo. Uma das teorias do envelhecimento é a de que esse acúmulo gradual de defeitos com o aumento da idade é a causa primária de muitos dos “sintomas” de envelhecimento, que incluem, por exemplo, o enfraquecimento progressivo dos músculos esquelético e cardíaco.

Uma característica única da herança mitocondrial é a variação entre células individuais e entre um organismo e outro quanto aos efeitos de uma mutação do mtDNA. Uma célula típica tem centenas ou milhares de mitocôndrias, cada uma com múltiplas cópias do seu próprio genoma (Figura 19-42b). Os animais herdam essencialmente todas as suas mitocôndrias da mãe. Os óvulos são grandes e contêm 10^5 ou 10^6 mitocôndrias, ao passo que os espermatozoides são bem menores e contêm bem menos mitocôndrias – talvez de 100 a 1.000. Além disso, existe um mecanismo ativo que marca as mitocôndrias derivadas dos espermatozoides para a degradação no ovo fertilizado. Logo depois da fertilização, fagossomos maternos migram para o local de entrada dos espermatozoides, englobam suas mitocôndrias e as degradam.

Suponha que, em um organismo feminino, um dano a um genoma mitocondrial ocorra em uma célula germinativa da qual se desenvolvem os ovócitos, de forma que a célula germinativa contenha principalmente mitocôndrias com os genes do tipo selvagem (sem a mutação), porém uma mitocôndria com um gene mutante. No decurso da maturação do ovócito, à medida que essa célula germinativa e seus descendentes dividem-se repetidamente, a mitocôndria com defeito replica-se, e os membros de sua progênie, todos defeituosos, são aleatoriamente distribuídos entre as células-filhas. Em certo ponto, o óvulo maduro contém diferentes proporções da mitocôndria defeituosa. Quando um óvulo é

fertilizado e sofre as muitas divisões do desenvolvimento embrionário, as células somáticas resultantes diferem na proporção de mitocôndrias mutantes (Figura 19-42a). Essa **heteroplasmia** (ao contrário da **homoplasmia**, na qual todo o genoma mitocondrial em todas as células é o mesmo) resulta em fenótipos mutantes, com graus variáveis de gravidade. Células (e tecidos) que contêm principalmente mitocôndrias do tipo selvagem (sem mutação) têm o fenótipo normal; elas são essencialmente normais. Outras células heteroplásmicas terão fenótipos intermediários, algumas sendo quase normais, outras (com grande proporção de mitocôndrias mutantes) anormais (Figura 19-42b). Se o fenótipo anormal estiver associado a alguma doença (ver a seguir), pessoas com a mesma mutação de mtDNA podem apresentar sintomas da doença com gravidade diferente – dependendo do número e da distribuição das mitocôndrias afetadas.

Algumas mutações nos genomas mitocondriais causam doenças



Cerca de 1 a cada 5 mil pessoas apresenta uma mutação causadora de doença em uma proteína mitocondrial, que reduz a capacidade da célula de produzir ATP. Um número crescente dessas doenças tem sido atribuído a mutações em genes mitocondriais (Figura 19-43). Alguns tipos de células e de tecidos – neurônios, miócitos dos músculos cardíaco e esquelético e células β do pâncreas – são menos capazes do que outros de tolerar uma produção reduzida de ATP, sendo, portanto, mais afetados por mutações nas proteínas mitocondriais.

Um grupo de doenças genéticas conhecidas como **encefalomiopatias mitocondriais** afeta principalmente o encéfalo e o músculo esquelético. Essas doenças são invariavelmente herdadas da mãe, porque, conforme observa-

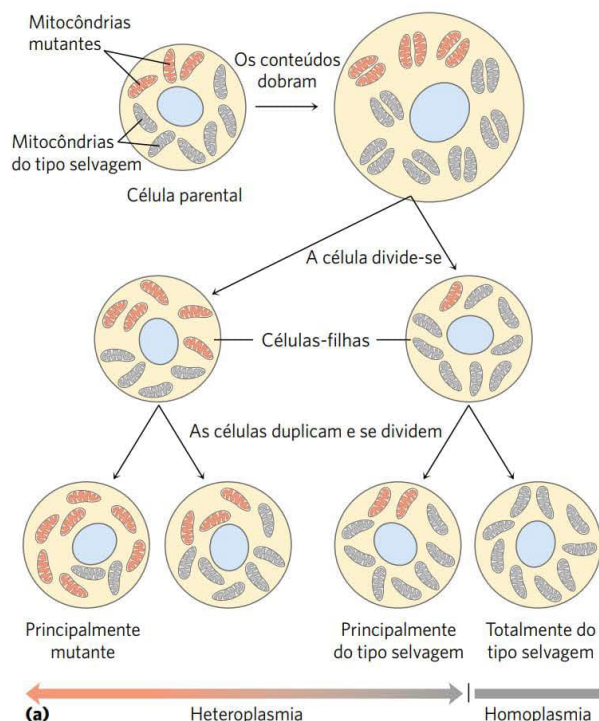
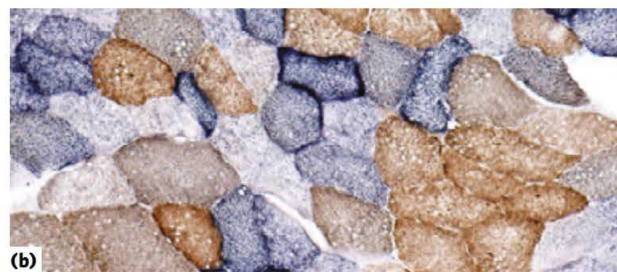


FIGURA 19-42 Heteroplasmia em genomas mitocondriais. (a) Quando um óvulo maduro é fertilizado, todas as mitocôndrias na célula diploide resultante (zigoto) são de origem materna; nenhuma vem do espermatozoide. Se uma fração das mitocôndrias maternas tem um gene mutante, a distribuição aleatória das mitocôndrias durante divisões celulares subsequentes produz algumas células-filhas com predomínio de mitocôndrias mutantes, algumas contendo principalmente mitocôndrias do tipo selvagem e algumas intermediárias. Assim, as células-filhas mostram graus variáveis de heteroplasmia. (b) Diferentes graus de heteroplasmia produzem diferentes fenótipos celulares. Este corte do tecido muscular humano é de uma pessoa com citocromo-oxidase defeituosa. As células foram coradas para tornar as células do tipo selvagem azuis, e as células com citocromo-oxidase defeituosa, marrons. Conforme mostra a micrografia, células diferentes no mesmo tecido são afetadas em graus diferentes pela mutação mitocondrial. [Fonte: (b) cortesia de Rob Taylor. Reimpressa, com permissão, de R. W. Taylor e D. M. Turnbull, *Nature Rev. Genet.* 6:389, 2005, Fig. 2a.]



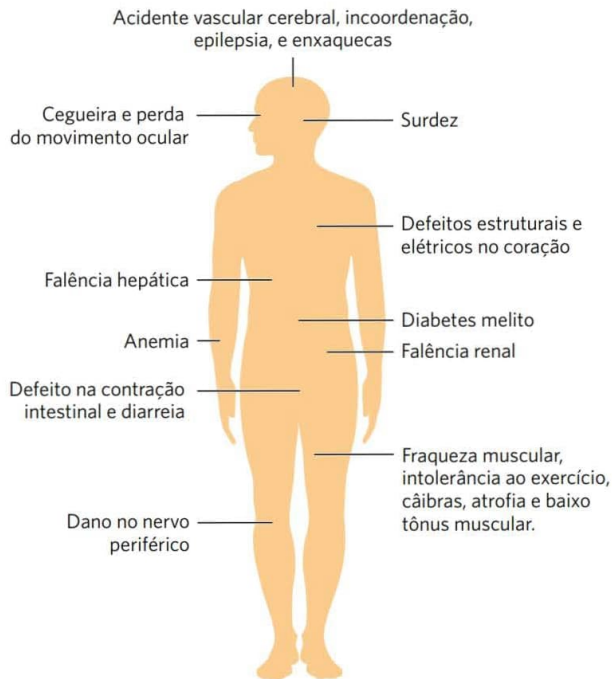


FIGURA 19-43 Mutações que causam doenças mitocondriais. Mutações em genes que codificam proteínas mitocondriais podem levar a doenças que afetam muitos órgãos e sistemas. [Fonte: informação obtida de S. B Vafai e V. K. Mootha, *Nature* 491:374, 2012.]

do anteriormente, todas as mitocôndrias de um embrião em desenvolvimento derivam do óvulo. A doença rara **neuropatia óptica hereditária de Leber (LHON)** afeta o sistema nervoso central, incluindo os nervos ópticos, causando a perda bilateral da visão em jovens adultos. Uma única mudança em uma base no gene mitocondrial *ND4* (Figura 19-40) muda um resíduo de Arg para um resíduo de His em um polipeptídeo do complexo I, e o resultado são mitocôndrias parcialmente defeituosas na transferência de elétrons do NADH à ubiquinona. Embora essas mitocôndrias possam produzir algum ATP pela transferência de elétrons a partir do succinato, elas aparentemente não suprem ATP suficiente para sustentar o metabolismo muito ativo dos neurônios, incluindo o nervo óptico. Uma única mudança em uma base do gene mitocondrial do citocromo *b*, um componente do complexo III, também produz a neuropatia óptica hereditária de Leber, demonstrando que a patologia resulta de uma redução geral da função mitocondrial, não especificamente de um defeito na transferência de elétrons pelo complexo I.

Uma mutação em *ATP6* afeta o poro de prótons na ATP-sintase, levando a baixas velocidades de síntese de ATP, enquanto mantém a cadeia respiratória intacta. O estresse oxidativo devido ao suprimento continuado de elétrons do NADH aumenta a produção de ERO, e o dano às mitocôndrias causado por essas espécies estabelece um ciclo vicioso. Uma a cada duas pessoas com este gene mutante morre dias ou meses após o seu nascimento.

A **síndrome da epilepsia mioclônica com fibras rotas vermelhas (MERRF)**, do inglês, *myoclonic epilepsy and ragged-red fiber syndrome*) é causada por uma mu-

tação no gene mitocondrial que codifica um tRNA específico para lisina ($tRNA^{Lys}$). Essa doença, caracterizada por contrações musculares abruptas involuntárias, resulta da produção defeituosa de várias das proteínas que necessitam tRNA mitocondrial para suas sínteses. Fibras musculares esqueléticas de pessoas com MERRF têm mitocôndrias com formato anormal, que, às vezes, contêm estruturas paracristalinas (Figura 19-44). Acredita-se que outras mutações nos genes mitocondriais sejam responsáveis pela fraqueza muscular progressiva que caracteriza a miopatia mitocondrial e pela hipertrofia e a deterioração do músculo cardíaco na miocardiopatia hipertrófica.

Quando se sabe que determinada mulher que deseja ser mãe é carreadora de um gene mitocondrial patológico, a técnica de doação mitocondrial pode contornar a passagem do gene mutante para sua prole. Os genes nucleares dessa potencial mãe são transplantados microscopicamente para um óvulo enucleado de um doador com mitocôndrias saudáveis e, então, o óvulo é fertilizado *in vitro*, e o embrião resultante é transplantado para o útero da mãe. Este e outros procedimentos similares de “três genitores”, que foram aprovados no Reino Unido em 2015, levantam questões de ética que estão sendo vigorosamente debatidas.

Doenças mitocondriais também podem resultar de mutações em qualquer dos ~ 1.100 genes nucleares que codificam proteínas mitocondriais. Por exemplo, uma mutação em uma das proteínas do complexo IV codificadas no núcleo, a COX6B1, resulta em defeitos graves no desenvolvimento do encéfalo e em paredes mais espessas no músculo cardíaco. Outros genes nucleares codificam proteínas essenciais para a *reunião* dos complexos mitocondriais. Mutações nesses genes podem levar a doenças mitocondriais graves. ■

Uma forma rara de diabetes resulta de defeitos nas mitocôndrias das células β pancreáticas



O mecanismo que regula a liberação de insulina de células β pancreáticas está atrelado à concentração de ATP nestas células. Quando a glicose sanguínea está alta, as células β captam glicose e a oxidam por glicólise e ciclo do ácido cítrico, aumentando a [ATP] acima de um nível crítico (Figura 19-45). Quando a [ATP] excede este limiar,

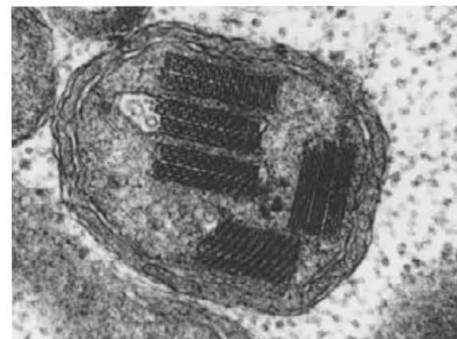


FIGURA 19-44 Inclusões paracristalinas em mitocôndria de indivíduo com MERRF. (b) Micrografia eletrônica de mitocôndria anormal do músculo de uma pessoa com MERRF, mostrando inclusões proteicas paracristalinas algumas vezes presentes nas mitocôndrias mutantes. [Fonte: D. Wallace et al., *Cell* 55:601, 1988. © Elsevier.]

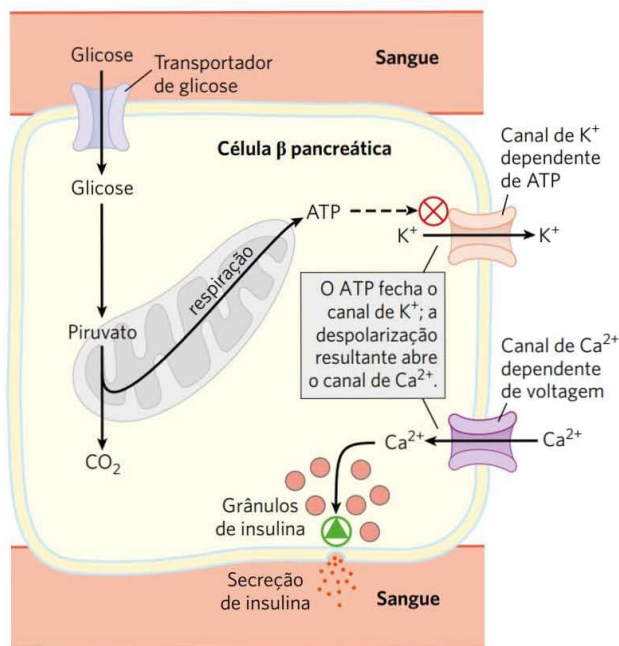


FIGURA 19-45 Um defeito mitocondrial impede a secreção de insulina. Na situação normal mostrada aqui, quando a glicose sanguínea aumenta, a produção de ATP nas células β aumenta. O ATP, bloqueando canais de K^+ , despolariza a membrana plasmática e, assim, abre os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem. O influxo de Ca^{2+} desencadeia a exocitose de vesículas secretoras contendo insulina, liberando este hormônio. Quando a fosforilação oxidativa em células β é defeituosa, a [ATP] nunca é suficiente para desencadear este processo, e a insulina não é liberada.

um canal de K^+ dependente de ATP na membrana plasmática fecha-se, despolarizando a membrana e desencadeando a liberação de insulina (ver Figura 23-28). As células β pancreáticas com defeitos na fosforilação oxidativa não podem aumentar a [ATP] acima desse limiar, e a falha resultante na liberação de insulina efetivamente produz o diabetes. Por exemplo, defeitos nos genes para glicocinase, a isoenzima hexocinase IV presente em células β , levam a uma forma rara de diabetes, MODY2 (ver Quadro 15-3); a baixa atividade da glicocinase impede a produção de [ATP] acima do valor crítico, bloqueando a secreção de insulina. Mutações nos genes mitocondriais de $tRNA^{Lys}$ e $tRNA^{Leu}$ também comprometem a produção mitocondrial de ATP, e o diabetes melito tipo 2 é comum entre pessoas com esses defeitos (embora esses casos constituam uma fração muito pequena de todos os casos de diabetes).

Quando a nicotinamida-nucleotídeo-transidrogenase, que é parte da defesa mitocondrial contra ERO (ver Figura 19-18), é geneticamente defeituosa, o acúmulo de ERO danifica as mitocôndrias, diminuindo a produção de ATP e bloqueando a liberação de insulina pelas células β (Figura 19-45). Os danos causados pelas ERO, incluindo dano ao mtDNA, também podem estar por trás de outras doenças humanas; existe alguma evidência de seu envolvimento nas doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington e na falência cardíaca, assim como no envelhecimento. ■

RESUMO 19.5 Genes mitocondriais: suas origens e efeitos das mutações

- Uma pequena proporção das proteínas mitocondriais humanas, 13 ao todo, é codificada pelo genoma mitocondrial e sintetizada nas mitocôndrias. Cerca de 1.100 proteínas mitocondriais são codificadas nos genes nucleares e importadas para as mitocôndrias depois de suas sínteses.
- As mitocôndrias surgiram de bactérias aeróbicas que entraram em relação endossimbiótica com eucariotos ancestrais.
- As mutações no genoma mitocondrial acumulam-se ao longo da vida do organismo. Mutações nos genes mitocondriais ou nucleares que codificam os componentes da cadeia respiratória, da ATP-sintase e do sistema de captura de ERO e mesmo dos genes de tRNA podem causar uma variedade de doenças humanas que, com frequência, afetam mais gravemente o músculo, o coração, as células β pancreáticas e o encéfalo.
- É possível combinar mitocôndrias de uma mulher com os genes nucleares de outra para criar um ovo sem mutações mitocondriais que levariam a uma doença mitocondrial.

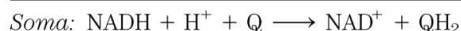
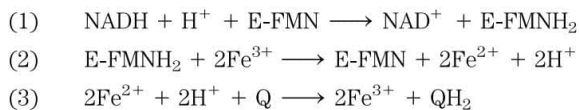
Termos-chave

Termos em negrito estão definidos no glossário.

teoria quimiosmótica 711	força próton-motriz 725
cadeia respiratória 712	ATP-sintase 729
flavoproteína 714	F₁-ATPase 732
equivalente redutor 714	catálise rotacional 735
ubiquinona (coenzima Q, Q) 714	modelo de troca de ligação 735
citocromos 715	razão P/O 738
proteína ferro-enxofre 716	razão P/2e ⁻ 738
proteína ferro-enxofre de Rieske 716	lançadeira do malato-aspartato 739
complexo I 717	lançadeira do glicerol-3-fosfato 739
NADH-desidrogenase 717	controle pelo aceitor 741
vetorial 718	razão das massas (Q) 741
complexo II 719	tecido adiposo marrom (TAM) 744
succinato-desidrogenase 719	proteína desacopladora 1 (UCP1) 744
espécies reativas de oxigênio (ERO) 719	citocromo P-450 744
radical superóxido ($\cdot O_2^-$) 720	xenobióticos 745
complexo III 720	apoptose 745
complexo de citocromos bc_1 720	apoptossomo 745
ciclo Q 721	caspase 745
complexo IV 721	heteroplasmia 748
citocromo-oxidase 721	homoplasmia 748
criomicroscopia crioelétrica 724	

Teste seu conhecimento

1. Reações de oxidação-redução O complexo I, ou complexo da NADH-desidrogenase da cadeia respiratória mitocondrial, promove a seguinte série de reações de oxidação-redução, nas quais Fe^{3+} e Fe^{2+} representam o ferro nos centros de ferro-enxofre, Q é ubiquinona, QH_2 é ubiquinol e E é a enzima:



Para cada uma das três reações catalisadas pelo complexo da NADH-desidrogenase, identifique (a) o doador de elétrons, (b) o receptor de elétrons, (c) o par *redox* conjugado, (d) o agente redutor e (e) o agente oxidante.

2. Todas as partes da ubiquinona têm uma função Na transferência de elétrons, apenas a porção quinona da ubiquinona sofre oxidação-redução; a cadeia lateral isoprenoide permanece inalterada. Qual a função desta cadeia?

3. Uso do FAD em vez do NAD^+ na oxidação do succinato Todas as desidrogenases da glicólise e do ciclo do ácido cítrico usam NAD^+ (E'° para $\text{NAD}^+/\text{NADH} = -0,32 \text{ V}$) como receptor de elétrons, exceto pela succinato-desidrogenase, que usa FAD covalentemente ligado (E'° para FAD/FADH_2 nessa enzima é $0,050 \text{ V}$). Sugira por que o FAD é um receptor de elétrons mais apropriado do que o NAD^+ na desidrogenação do succinato, com base nos valores de E'° para fumarato/succinato ($E'^{\circ} = 0,031 \text{ V}$), NAD^+/NADH e succinato-desidrogenase FAD/FADH_2 .

4. Grau de redução dos carreadores de elétrons na cadeia respiratória O grau de redução de cada carreador na cadeia respiratória é determinado pelas condições na mitocôndria. Por exemplo, quando NADH e O_2 são abundantes, o grau de redução em estado estacionário dos carreadores decresce à medida que os elétrons passam do substrato ao O_2 . Quando a transferência de elétrons é bloqueada, os carreadores antes do bloqueio tornam-se mais reduzidos e aqueles além do bloqueio tornam-se mais oxidados (ver Figura 19-6). Para cada uma das condições a seguir, preveja o estado de oxidação da ubiquinona e dos citocromos b , c_1 , c e $a + a_3$.

- NADH e O_2 abundantes, mas cianeto adicionado.
- NADH abundante, mas O_2 exaurido.
- O_2 abundante, mas NADH exaurido.
- NADH e O_2 abundantes.

5. Efeito da rotenona e da antimicina A na transferência de elétrons A rotenona, produto tóxico natural de plantas, inibe fortemente a NADH-desidrogenase em mitocôndrias de insetos e peixes. A antimicina A, um antibiótico tóxico, inibe fortemente a oxidação do ubiquinol.

- Explique por que a ingestão de rotenona é letal para algumas espécies de insetos e peixes.
- Explique por que a antimicina A é um veneno.
- Considerando que a rotenona e a antimicina A são igualmente efetivas em bloquear seus respectivos sítios na cadeia de transferência de elétrons, qual delas seria um veneno mais potente? Explique.

6. Desacopladores da fosforilação oxidativa Em mitocôndrias normais, a taxa de transferência de elétrons está fortemente acoplada à demanda por ATP. Quando a taxa de uso do ATP é relativamente baixa, a taxa de transferência de elétrons é baixa; quando a demanda por ATP aumenta, a taxa de transferência de elétrons aumenta. Sob essas condições de estreito acoplamento, o número de moléculas de ATP produzidas por átomo de oxigênio consumido quando o NADH é o doador de elétrons – a razão P/O – é de cerca de 2,5.

- Imagine o efeito de uma concentração relativamente baixa e de uma concentração relativamente alta de um agente desacoplador na taxa de transferência de elétrons e na razão P/O.
- A ingestão de desacopladores causa sudorese profusa e um aumento na temperatura corporal. Explique esse fenômeno em termos moleculares. O que acontece com a razão P/O na presença dos desacopladores?
- O desacoplador 2,4-dinitrofenol já foi prescrito como medicamento para o emagrecimento. Como esse agente poderia, a princípio, auxiliar na perda de peso? Agentes desacopladores não são mais prescritos, visto que algumas mortes ocorreram após seu uso. Por que a ingestão de desacopladores pode levar à morte?

7. Efeitos da valinomicina na fosforilação oxidativa Quando o antibiótico valinomicina (ver Figura 11-42) é adicionado a mitocôndrias que respiram ativamente, vários eventos acontecem: o rendimento da produção de ATP diminui, a taxa de consumo de O_2 aumenta, calor é liberado e o gradiente de pH através da membrana mitocondrial interna aumenta. A valinomicina age como um desacoplador ou como um inibidor da fosforilação oxidativa? Explique as observações experimentais em termos da capacidade do antibiótico de transferir íons K^+ através da membrana mitocondrial interna.

8. A concentração celular de ADP controla a formação de ATP Embora tanto ADP quanto P_i sejam necessários para a síntese de ATP, a velocidade de síntese depende principalmente da concentração de ADP e não da de P_i . Por quê?

9. Vantagens dos supercomplexos para a transferência de elétrons Existe evidência crescente de que os complexos mitocondriais I, II, III e IV sejam parte de um supercomplexo maior. Qual poderia ser a vantagem de ter todos os quatro complexos em um supercomplexo?

10. Quantos prótons em uma mitocôndria? A transferência de elétrons transloca prótons da matriz mitocondrial para o meio externo, estabelecendo um gradiente de pH através da membrana interna (o lado de fora mais ácido do que o de dentro). A tendência dos prótons de se difundirem de volta à matriz é a força propulsora para a síntese de ATP pela ATP-sintase. Em uma suspensão de mitocôndrias em um meio de pH 7,4, o pH da matriz foi avaliado em 7,7 durante a fosforilação oxidativa.

- Calcule a $[\text{H}^+]$ no meio externo e na matriz nessas condições.
- Qual a razão da $[\text{H}^+]$ entre o lado de fora e o lado de dentro? Comente sobre a energia inerente a essa diferença de concentração. (Dica: ver Equação 11-4; p. 413.)
- Calcule o número de prótons em uma mitocôndria hepática respirando ativamente, presumindo que seu compartimento matricial é uma esfera de $1,5 \mu\text{m}$ de diâmetro.
- A partir desses dados, o gradiente de pH sozinho é suficiente para gerar ATP?

- (e) Se não é, sugira de que forma surge a energia necessária para a síntese de ATP.

11. Taxa de renovação do ATP em músculo cardíaco de ratos O músculo cardíaco de ratos operando aerobicamente obtém mais de 90% das suas necessidades de ATP via fosforilação oxidativa. Cada grama de tecido consome O_2 na velocidade de $10 \mu\text{mol}/\text{min}$, com glicose como combustível.

- (a) Calcule a velocidade de consumo de glicose e a produção de ATP pelo músculo cardíaco.
(b) Para uma concentração de ATP em equilíbrio estacionário de $5 \mu\text{mol}/\text{g}$ de tecido muscular cardíaco, calcule o tempo necessário (em segundos) para repor completamente o conjunto (*pool*) celular de ATP. O que esse resultado indica sobre a necessidade de estreita regulação da produção de ATP? (Nota: as concentrações são expressas como micromoles por grama de tecido muscular porque o tecido é principalmente água.)

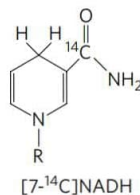
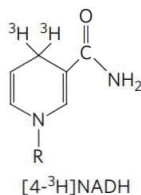
12. A taxa de quebra de ATP em músculo de voo de insetos A produção de ATP no músculo de voo da mosca *Lucilia sericata* resulta quase que exclusivamente da fosforilação oxidativa. Durante o voo, 187 mL de $O_2/\text{h}\cdot\text{g}$ de peso corporal são necessários para manter a concentração de ATP de $7 \mu\text{mol}/\text{g}$ de músculo. Considerando que o músculo de voo compreende 20% do peso da mosca, calcule a taxa de reposição do conjunto de ATP no músculo de voo. Quanto tempo duraria o reservatório de ATP na ausência da fosforilação oxidativa? Considere para o cálculo que os equivalentes redutores são transferidos pela lançadeira do glicerol-3-fosfato e que o O_2 está a 25°C e a $101,3 \text{ kPa}$ (1 atm).



13. Altos níveis de alanina no sangue associados a defeitos na fosforilação oxidativa Em sua maioria, as pessoas com defeitos genéticos na fosforilação oxidativa têm concentrações relativamente altas de alanina no sangue. Explique isso em termos bioquímicos.

14. Compartimentalização dos componentes do ciclo do ácido cítrico A isocitrato-desidrogenase é encontrada apenas na mitocôndria, mas a malato-desidrogenase é encontrada tanto no citosol quanto na mitocôndria. Qual o papel da malato-desidrogenase citosólica?

15. Movimento transmembrana de equivalentes redutores Sob condições aeróbicas, o NADH extramitocondrial precisa ser oxidado pela cadeia respiratória mitocondrial. Considere um preparado de hepatócitos de ratos contendo mitocôndrias e todas as enzimas citosólicas. Se $[4\text{-}^3\text{H}]\text{NADH}$ é introduzido, radioatividade logo aparece na matriz mitocondrial. No entanto, se $[7\text{-}^{14}\text{C}]\text{NADH}$ é introduzido, nenhuma radioatividade aparece na matriz. O que essas observações revelam sobre a oxidação do NADH extramitocondrial pela cadeia respiratória?



16. Conjuntos (*pools*) de NAD^+ e atividades de desidrogenases Embora tanto a piruvato-desidrogenase quanto a gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase usem NAD^+ como acep-

tor de elétrons, as duas enzimas não competem pelo mesmo conjunto de NAD^+ celular. Por quê?

17. O sistema de transporte do malato- α -cetoglutarato O sistema de transporte que conduz malato e α -cetoglutarato através da membrana mitocondrial interna (ver Figura 19-31) é inibido por *n*-butilmalonato. Suponha que o *n*-butilmalonato seja adicionado a uma suspensão aeróbica de células renais usando exclusivamente glicose como combustível. Preveja o efeito desse inibidor sobre (a) a glicólise, (b) o consumo de oxigênio, (c) a formação de lactato e (d) a síntese de ATP.

18. Escalas de tempo dos eventos regulatórios em mitocôndrias Compare as prováveis escalas de tempo para os ajustes na velocidade da respiração causados pelo (a) aumento na $[\text{ADP}]$ e pela (b) redução na pO_2 . O que explica essa diferença?

19. O efeito Pasteur Quando O_2 é adicionado a uma suspensão anaeróbica de células consumindo glicose em alta velocidade, essa velocidade diminui marcadamente à medida que o O_2 é consumido, e o acúmulo de lactato cessa. Esse efeito, primeiramente observado por Louis Pasteur na década de 1860, é característico da maioria das células capazes tanto de catabolismo aeróbico quanto anaeróbico da glicose.

- (a) Por que o acúmulo de lactato cessa depois que o O_2 é adicionado?
(b) Por que a presença de O_2 diminui a taxa de consumo de glicose?
(c) De que forma o início do consumo de O_2 reduz a taxa de consumo de glicose? Explique em termos de enzimas específicas.

20. Mutantes de leveduras com deficiências na respiração e a produção de etanol Mutantes de leveduras com deficiências na respiração (p^- ; "petites") podem ser produzidos a partir de genitores do tipo selvagem por um tratamento com agentes mutagênicos. Os mutantes carecem de citocromo-oxidase, déficit que afeta consideravelmente seu comportamento metabólico. Um efeito notável é que a fermentação não é suprimida por O_2 – ou seja, os mutantes não apresentam o efeito Pasteur (ver Problema 19). Algumas empresas estão muito interessadas em usar esses mutantes para fermentar cavacos de madeira até etanol para uso energético. Explique a vantagem de usar esses mutantes em vez de leveduras do tipo selvagem para produção de etanol em larga escala. Por que a ausência da citocromo-oxidase elimina o efeito Pasteur?



21. Doença mitocondrial e câncer Mutações nos genes que codificam certas proteínas mitocondriais estão associadas à alta incidência de certos tipos de câncer. De que forma mitocôndrias com defeitos podem levar ao câncer?



22. Gravidade variável de uma doença mitocondrial Pessoas diferentes com uma doença causada pelo mesmo defeito específico no genoma mitocondrial podem ter sintomas que variam de moderados a graves. Explique por quê.



23. O diabetes como consequência de defeitos mitocondriais A glicocinase é essencial para o metabolismo da glicose em células β pancreáticas. Os seres humanos com duas cópias defeituosas do gene da glicocinase exibem diabetes neonatal grave, ao passo que aqueles com apenas uma cópia defeituosa do gene têm uma forma bem mais moderada

da doença (diabetes juvenil com início na maturidade; MODY2, do inglês, *mature onset diabetes of the young*). Explique essa diferença em termos da biologia das células β .



24. Efeitos das mutações no complexo II mitocondrial

Mudanças em um único nucleotídeo no gene da succinato-desidrogenase (complexo II) estão associadas a tumores carcinoides do intestino médio. Sugira um mecanismo para explicar essa observação.

Problema de análise de dados

25. Identificando uma proteína central para a atividade da ATP-sintase Muito de nosso conhecimento sobre as etapas da cadeia respiratória e o mecanismo da ATP-sintase vem da dissecação da via utilizando vários inibidores e desacopladores (ver Tabela 19-4), além de bactérias mutantes. Neste problema, veremos como Robert Fillingame utilizou a diciclo-hexilcarbodiimida (DCCD) e mutantes de *E. coli* resistentes a seus efeitos para identificar os componentes que posteriormente vieram a ser conhecidos como as subunidades *c* da porção F_0 da ATP-sintase.

A DCCD reage com grupos carboxila nas cadeias laterais de resíduos de Asp e Glu. Quando DCCD é adicionada à suspensão de mitocôndrias intactas, respirando ativamente, a velocidade de transferência de elétrons (medida pelo consumo de O_2) e de produção de ATP diminui drasticamente. Se uma solução de 2,4-dinitrofenol (DNF) é agora adicionada ao preparado, o consumo de O_2 retorna ao normal, mas a produção de ATP permanece inibida.

- Explique o efeito do 2,4-dinitrofenol no preparado mitocondrial inibido.
- Qual processo é afetado diretamente pela DCCD, a transferência de elétrons ou a síntese de ATP?

A *E. coli* realiza a fosforilação oxidativa com uma maquinaria notavelmente similar à dos mamíferos, e esta bactéria é muito mais fácil de trabalhar no que tange à seleção de mutantes. A adição de DCCD a uma cultura de *E. coli* do tipo selvagem (cepa AN180) crescendo aerobicamente impede a continuidade do crescimento de modo tempo e dose-dependente.

Fillingame selecionou um mutante de *E. coli* resistente à DCCD (RF-7) para o qual o crescimento aeróbico havia sido apenas levemente diminuído na presença de DCCD. A seguir, ele precisou demonstrar que o componente resistente à DCCD em suas cepas de *E. coli* era a ATP-sintase. Ele isolou a fração de membrana das cepas RF-7 e do tipo selvagem e avaliou a atividade de ATPase nessas frações na presença e na ausência de DCCD. Ele encontrou inibição da atividade ATPásica tempo e dose-dependente na fração de membranas do tipo selvagem, mas não na fração de membranas RF-7.

- Por que nesse teste Fillingame mediu a atividade ATPásica, em vez da atividade de ATP-sintase?
- A proteína capaz de se ligar à DCCD está ausente no mutante RF-7 ou foi apenas alterada?

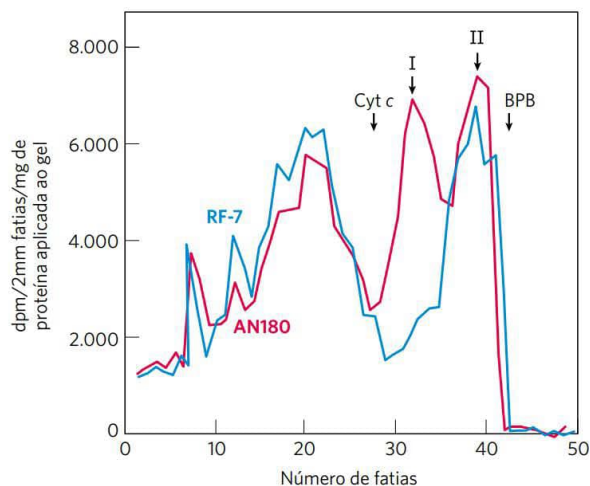
Fillingame queria determinar se a proteína sensível à DCCD era parte integral da membrana ou se poderia ser solubilizada na fração que continha a atividade de ATPásica. Ele preparou frações de “membrana sem as proteínas superficiais” e de “ATPase solúvel” a partir

de organismos do tipo selvagem e mutantes RF-7, tratando as membranas intactas com ditiotretol. A seguir, ele mediu a atividade ATPásica nas membranas nativas, nas frações de membranas e nos sistemas reconstituídos a partir de misturas (sistemas híbridos) de membranas com a fração solúvel, obtidos de cepas do tipo selvagem ou do mutante RF-7. As membranas nativas e os sistemas reconstituídos todos apresentaram atividade ATPásica; as frações de membranas sem suas proteínas superficiais apresentaram muito pouca atividade de ATPase. Tendo estabelecido que todas as combinações de sistemas reconstituídos apresentavam atividade de ATPase similar, Fillingame, então, adicionou DCCD para ver quais combinações eram inibidas.

- Quais resultados você esperaria se a proteína capaz de se ligar à DCCD estivesse na fração de membranas? O que você esperaria se essa proteína estivesse na fração solúvel?

Os resultados foram claros. Para a fração de membranas de células do tipo selvagem, a ATPase reconstituída era sensível à DCCD, independentemente da fonte da fração solúvel. Para a fração de membranas de células mutantes, a ATPase reconstituída era insensível à DCCD. Desse modo, a sensibilidade à DCCD deve-se a uma proteína na fração de membranas, e não a uma proteína na fração solubilizada com ditiotretol.

Para identificar a proteína sensível à DCCD, Fillingame expôs membranas intactas de células de *E. coli* do tipo selvagem (AN180) e de RF-7 à DCCD marcada com ^{14}C , usando após eletroforese em gel de poliácridamida (SDS-PAGE) para separar as proteínas. Ele cortou o gel em fatias finas desde a parte inferior até o topo e determinou o conteúdo de ^{14}C de cada fatia, medido como desintegrações por minuto (dpm) por 2 mm de fatia de gel, normalizadas em relação à quantidade de proteína aplicada ao gel. A distância de migração é igual ao número da fatia vezes 2 mm. Os resultados foram colocados no gráfico a seguir. As setas denotam o citocromo *c*, utilizado como marcador de massa molecular; I e II, picos de interesse; e BPB, azul de bromofenol, um corante usado para indicar a frente de migração para a amostra, à medida que ela se move através do gel. Muitas proteínas de cada amostra estavam marcadas com $[^{14}C]DCCD$ (medidas em dpm, desintegrações por minuto).



- (f) Como Fillingame sabia qual(is) proteína(s) marcada(s) era(m) de interesse?
- (g) Quando ele repetiu os experimentos utilizando as frações de membrana desprovidas das proteínas periféricas, preparadas como no experimento acima, ele descobriu que a mesma proteína era marcada especificamente na fração do tipo selvagem. Por que esse passo foi necessário?
- (h) Foi determinado que a proteína de interesse tinha um M_r de cerca de 9 kDa e era facilmente solúvel em um solvente bastante apolar (clorofórmio/metanol). O que Fillingame poderia deduzir acerca da estrutura, da localização e da topologia dessa proteína?
- (i) Em um trabalho posterior, Fillingame observou que o resíduo que reage com DCCD nesta proteína era Asp⁶¹. Um mutante de *E. coli* no qual essa proteína tem um resíduo

de Ser substituído por Ala²¹ é muito menos sensível à inibição por DCCD que células do tipo selvagem. Que explicação pode ser dada para essa observação?

- (j) Intensos estudos desta proteína inibida por DCCD mostraram que ela é uma parte central da F_0F_1 ATP-sintase de bactérias, plantas e animais. Qual é seu papel na fosforilação oxidativa?

Referência

Fillingame, R.H. 1975. Identification of the dicyclohexylcarbodiimide-reactive protein component of the adenosine 59-triphosphate energy-transducing system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 124:870–883.

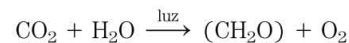
Fotossíntese e síntese de carboidratos em plantas

- 20.1 Absorção de luz 756
- 20.2 Centros de reações fotoquímicas 763
- 20.3 Síntese de ATP pela fotofosforilação 774
- 20.4 Evolução da fotossíntese oxigênica 776
- 20.5 Reações de fixação de carbono 780
- 20.6 Fotorrespiração e as vias C4 e CAM 792
- 20.7 Biossíntese de amido, sacarose e celulose 798
- 20.8 Integração do metabolismo de carboidratos em plantas 804

Este capítulo marca um ponto decisivo no estudo do metabolismo celular. Até agora, na Parte II, foi descrito de que modo os principais combustíveis metabólicos – carboidratos, ácidos graxos e aminoácidos – são degradados por vias *catabólicas* convergentes para ingressarem no ciclo do ácido cítrico e entregarem seus elétrons à cadeia respiratória, promovendo a síntese de ATP via fosforilação *oxidativa*. Agora o foco é direcionado à síntese de ATP acoplada ao fluxo de elétrons para o oxigênio *impulsionado pela luz* e, a seguir, às vias *anabólicas*, que usam energia química na forma de ATP e NADH ou NADPH para sintetizar componentes celulares a partir de moléculas precursoras simples. As vias anabólicas geralmente são redutoras, em vez de oxidativas. O catabolismo e o anabolismo ocorrem simultaneamente em um estado estacionário dinâmico, de forma que a degradação geradora de energia de componentes celulares é contrabalançada por processos biossintéticos, os quais criam e mantêm a intrincada organização das células vivas.

A captura da energia solar por organismos fotossintéticos e sua conversão na energia química de compostos orgânicos reduzidos é a fonte elementar de quase toda a energia biológica e de precursores orgânicos na Terra. A evolução da fotossíntese com liberação de oxigênio, cerca de 2,5 bilhões de anos atrás, e o consequente aumento

no oxigênio atmosférico delinearam a paisagem metabólica que herdamos. Organismos fotossintéticos e heterotróficos vivem em um estado estacionário na biosfera (**Figura 20-1**). Os organismos fotossintéticos capturam a energia solar e formam ATP e NADPH, usados como fonte de energia para sintetizar carboidratos e outros compostos orgânicos a partir de CO_2 e H_2O ; de modo simultâneo, eles liberam O_2 na atmosfera.



Heterótrofos aeróbios (p. ex., seres humanos, assim como plantas durante períodos escuros) usam o O_2 formado desse modo para degradar os produtos orgânicos ricos em energia da fotossíntese em CO_2 e H_2O , gerando ATP. O CO_2 retorna à atmosfera para ser usado novamente pelos organismos fotossintéticos. Assim, a energia solar fornece a força propulsora para a ciclagem contínua de CO_2 e O_2 na biosfera, fornecendo também os substratos reduzidos – combustíveis como a glicose – dos quais dependem os organismos não fotossintéticos.

Neste capítulo, iniciamos com a **fotossíntese**, que compreende dois processos: as **reações fotodependentes**, em que a luz solar fornece a energia para a síntese de ATP e NADPH, e as **reações de assimilação de carbono** (ou **reações de fixação de carbono**), nas quais o ATP e o NADPH são utilizados para reduzir o CO_2 para formar trioses-fosfato via um conjunto de reações, conhecido como ciclo de Calvin (**Figura 20-2**). A fotorrespiração é uma reação colateral não produtiva que ocorre durante a fixação de CO_2 , e consideraremos diversas formas pelas quais as plantas podem evitar isso. Discutiremos, a seguir, a conversão das trioses produzidas no ciclo de Calvin em sacarose (para o transporte de açúcar) e amido (para armazenamento de energia), o que é realizado por mecanismos análogos àqueles utilizados pelas células animais para produzir glicogênio, e descreveremos a síntese de celulose, constituinte das paredes das células vegetais. Por fim, consideraremos como o metabolismo dos carboidratos está integrado na célula vegetal e na estrutura do vegetal como um todo.

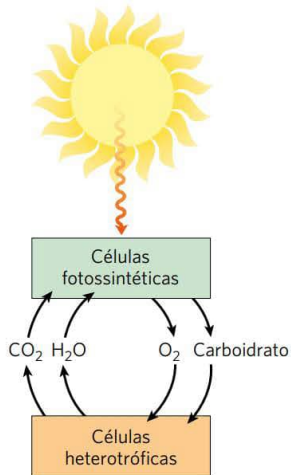


FIGURA 20-1 A energia solar como a fonte elementar de toda a energia biológica. Os organismos fotossintéticos utilizam a energia da luz solar para produzir glicose e outros produtos orgânicos, os quais as células heterotróficas usam como fontes de energia e de carbono.

20.1 Absorção de luz

O processo de **fotofosforilação** assemelha-se à fosforilação oxidativa (Capítulo 19) pelo fato de que o fluxo de elétrons através de uma série de transportadores de elétrons constituintes da membrana está acoplado ao bombeamento de prótons, produzindo a força próton-motriz

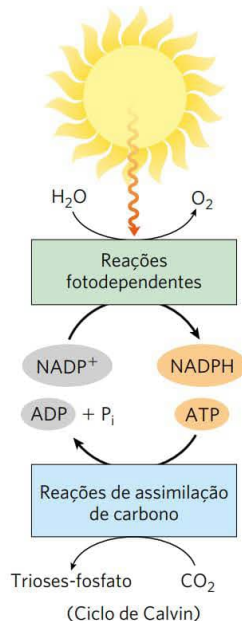


FIGURA 20-2 As reações fotodependentes da fotossíntese geram NADPH e ATP às custas da energia solar. NADPH e ATP são usados nas reações de assimilação de carbono, que ocorrem na luz ou na escuridão, reduzindo CO_2 para formar trioses e compostos mais complexos (como glicose e sacarose) derivados das trioses.

que fornece energia para a síntese de ATP. Na fosforilação oxidativa, o doador de elétrons é o NADH e oceptor final de elétrons é o O_2 , formando H_2O . Na fotofosforilação, os elétrons fluem no sentido oposto: H_2O é o doador de elétrons e o NADPH é formado. Como podem ocorrer esses processos endergônicos?

A água não é um bom doador de elétrons; seu potencial de redução padrão é de 0,816 V, comparado com $-0,320$ V para o NADH, um bom doador de elétrons. A fotossíntese requer energia na forma de luz para *criar* um bom doador de elétrons e um bom receptor de elétrons. Os elétrons fluem do doador, atravessando de uma série de carreadores ligados à membrana, incluindo citocromos, quinonas e proteínas contendo centros ferro-enxofre, ao passo que os prótons são bombeados através da membrana para criar um potencial eletroquímico. A transferência de elétrons e o bombeamento de prótons são catalisados por complexos na membrana análogos em estrutura e função ao complexo III das mitocôndrias. O potencial eletroquímico que eles produzem é a força propulsora para a síntese de ATP a partir de ADP e P_i , catalisada por um complexo de ATP-sintase ligado à membrana, muito similar àquele de mitocôndrias e bactérias. O processo é resumido na **Figura 20-3**.

Os cloroplastos são o sítio onde ocorre o fluxo de elétrons impulsionado pela luz e a fotossíntese nos vegetais

Em células eucarióticas fotossintéticas, tanto as reações fotodependentes quanto as de assimilação de carbono ocorrem nos **cloroplastos** (**Figura 20-4**), organelas intracelulares variáveis em forma e geralmente com poucos micrômetros de diâmetro. Da mesma forma que as mitocôndrias, eles são circundados por duas membranas, uma membrana externa, permeável a pequenas moléculas e íons, e uma membrana interna, que delimita o compartimento interno. Esse compartimento é denominado **estroma** nos cloroplastos e é análogo à matriz mitocondrial; consiste em uma fase aquosa contendo a maior parte das enzimas necessárias para as reações de assimilação de carbono. No estroma, existe um conjunto altamente convoluto de membranas internas, análogo às cristas mitocondriais; essas membranas são topologicamente contínuas, formando um único compartimento, ou **lúmen**. Esse sistema membranoso complexo forma sacos achatados, chamados de **tilacoides**. Os **tilacoides dos grana** são bolsas em formato de discos arranjados em pilhas; eles são conectados por **tilacoides do estroma**, que são mais achatados e se espiralam ao redor dos grana. Embebidos nas membranas tilacoides (comumente chamadas de **lamelas**) estão os pigmentos fotossintéticos e os complexos enzimáticos que realizam as reações fotodependentes da síntese de ATP. O sistema de membranas e os componentes nele embebidos estão constantemente sendo remodelados, adaptando-se a mudanças na disponibilidade de luz e nas necessidades de energia e de poder redutor da planta. As membranas internas dos cloroplastos, como de todos os plastídeos, são impermeáveis a moléculas polares e carregadas. O trânsito através dessas membranas é mediado por conjuntos de transportadores específicos.

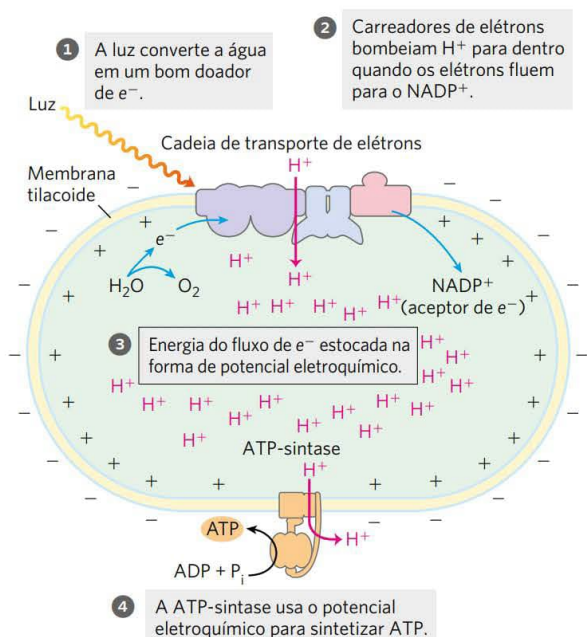


FIGURA 20-3 O mecanismo quimiosmótico para a síntese de ATP nos cloroplastos. O movimento de elétrons através de uma cadeia de transporte ligada à membrana é impulsionado pela energia de fótons absorvidos por um pigmento verde, a clorofila. O fluxo de elétrons leva ao movimento de prótons e cargas positivas através da membrana, criando um potencial eletroquímico. Esse potencial eletroquímico propicia energia para a síntese de ATP pela ATP-sintase ligada à membrana, que é fundamentalmente similar, em estrutura e mecanismo, à ATP-sintase da mitocôndria. Uma comparação com a Figura 19-1 mostra as muitas similaridades e as diferenças significativas na síntese quimiosmótica de ATP nos cloroplastos e nas mitocôndrias.

Os cloroplastos são apenas um entre diversos tipos de **plastídeos**, organelas características de plantas e algas. Plastídeos são organelas que se autorreproduzem separadamente do resto da célula, delimitadas por uma membrana dupla e contendo um pequeno genoma, o **plastoma**, que codifica algumas de suas proteínas. A maioria das proteínas destinadas aos plastídeos é codificada em genes nucleares, os quais são transcritos e traduzidos como outros genes nucleares; as proteínas são, então, transportadas para os plastídeos. Os plastídeos se reproduzem por fissão binária, replicando seus genomas (uma molécula única de DNA circular) e usando suas próprias enzimas e seus ribossomos para sintetizar as proteínas codificadas pelo genoma. Os **amiloplastos** são plastídeos incolores (ou seja, carecem de clorofila e de outros pigmentos encontrados nos cloroplastos). Eles não apresentam membranas internas análogas às membranas fotossintéticas (tilacoides) dos cloroplastos e, em tecidos vegetais ricos em amido, esses plastídeos estão repletos de grânulos de amido (**Figura 20-5**). Os cloroplastos podem ser convertidos em **proplastídeos** pela perda de suas membranas internas e da clorofila, e estes são interconvertíveis com os amiloplastos (**Figura 20-6**). Por sua vez, tanto amiloplastos quan-

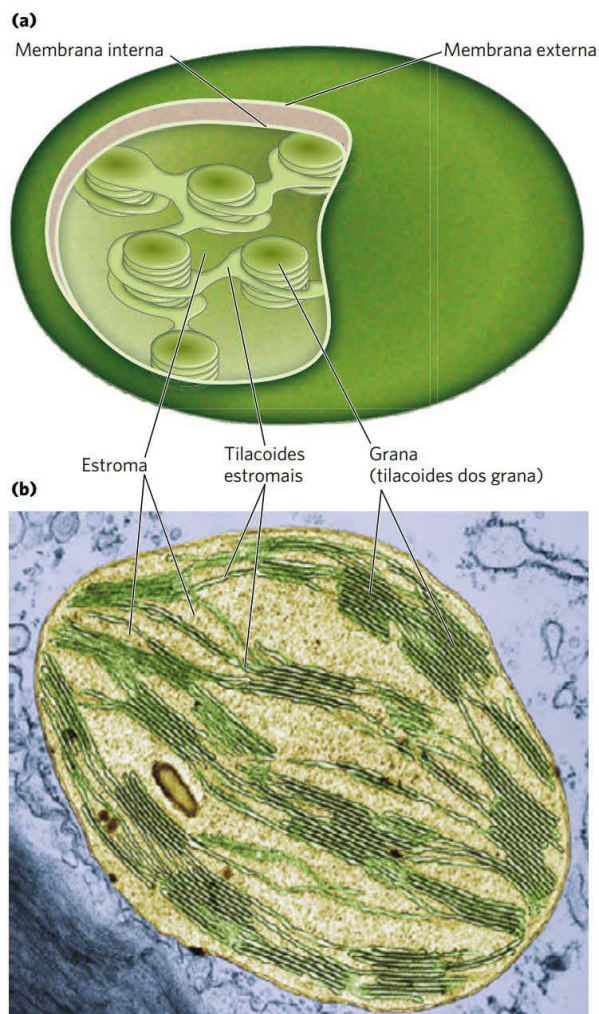
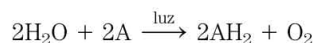


FIGURA 20-4 Estrutura do cloroplasto. (a) Diagrama esquemático. (b) Micrografia eletrônica em grande aumento, mostrando a estrutura altamente organizada das membranas dos tilacoides. [Fonte: (b) Biophoto Associates/Science Source.]

to proplastídeos podem se desenvolver em cloroplastos. A abundância relativa dos tipos de plastídeos depende do tipo de tecido vegetal e da intensidade de iluminação. As células de folhas verdes são ricas em cloroplastos, ao passo que os amiloplastos são predominantes nos tecidos não fotossintéticos que armazenam grandes quantidades de amido, como os tubérculos de batata.

Em 1937, Robert Hill verificou que, quando extratos de folhas contendo cloroplastos eram iluminados, eles (1) liberavam O_2 e (2) reduziam um aceptor de elétrons não biológico adicionado ao meio, de acordo com a **reação de Hill**:



em que A é um aceptor artificial de elétrons, ou **reagente de Hill**. Um reagente de Hill, o corante 2,6-diclorofenolín-

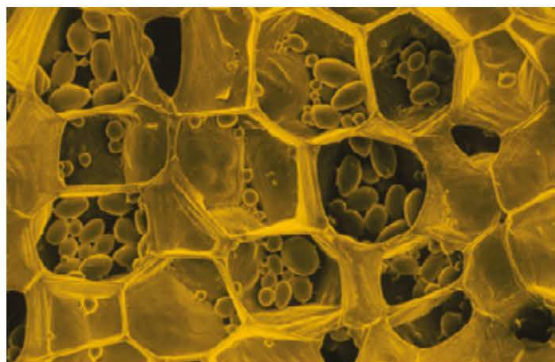


FIGURA 20-5 Amiloplastos preenchidos com amido. Essa micrografia eletrônica por varredura colorizada de uma fatia de batata crua mostra as células cheias de amiloplastos, as organelas nas quais os grânulos de amido são armazenados. Os grânulos de amido em vários tecidos variam de 1 a 100 μm de diâmetro. [Fonte: Dr. Jeremy Burgess/Science Source.]

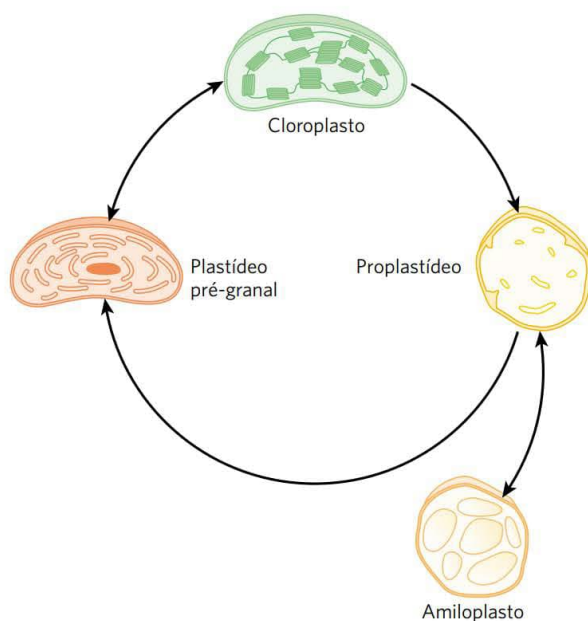
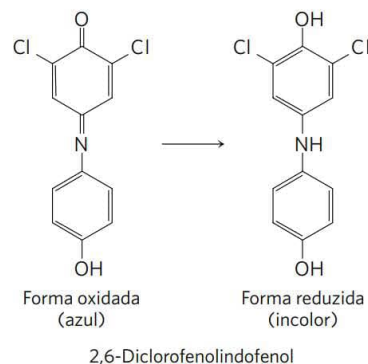
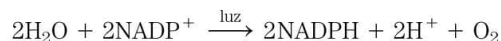


FIGURA 20-6 Plastídeos: suas origens e interconversões. Todos os tipos de plastídeos são delimitados por uma membrana dupla, e alguns (em especial os cloroplastos maduros) têm extensas membranas internas. As membranas internas podem ser perdidas (quando um cloroplasto maduro se torna um proplastídeo) e ressintetizadas (quando um proplastídeo dá origem a um plastídeo pré-granal e, então, a um cloroplasto maduro). Os proplastídeos em tecidos não fotossintéticos (como raízes) dão origem a amiloplastos, que contêm grandes quantidades de amido. Todas as células vegetais têm plastídeos, e estas organelas são o sítio não apenas da fotossíntese, mas de outros processos, incluindo a síntese de aminoácidos essenciais, de tiamina, de piridoxal-fosfato, de flavinas e de vitaminas A, C, E e K.

dofenol, é azul quando oxidado (A) e incolor quando reduzido (AH_2), tornando a reação fácil de ser acompanhada:



Quando um extrato foliar suplementado com o corante foi iluminado, o corante azul se tornou incolor e O_2 foi liberado. No escuro, nem a liberação de O_2 e nem a redução do corante aconteceram. Essa foi a primeira evidência de que a energia luminosa absorvida faz os elétrons fluírem da água para um aceptor de elétrons. Além disso, Hill constatou que o CO_2 não era necessário e nem reduzido a uma forma estável sob essas condições; a liberação de O_2 podia ser dissociada da redução do CO_2 . Vários anos depois, Severo Ochoa mostrou que o NADP^+ é o aceptor biológico de elétrons nos cloroplastos, de acordo com a equação



Para compreender esse processo fotoquímico, precisa-se primeiro considerar o tópico mais geral dos efeitos da absorção de luz na estrutura molecular.

A luz visível é a radiação eletromagnética de comprimentos de onda de 400 a 700 nm, uma pequena parte do espectro eletromagnético (**Figura 20-7**), variando do violeta ao vermelho. A energia de um único **fóton** (um quantum de luz) é maior na extremidade violeta do espectro do que na extremidade vermelha; comprimentos de onda mais curtos (e com maior frequência) correspondem a uma maior energia. A energia, E , de um único fóton de luz visível é dada pela equação de Planck:

$$E = h\nu = hc/\lambda$$

em que h é a constante de Planck ($6,626 \times 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$), ν é a frequência da luz em ciclos/s, c é a velocidade da luz ($3,00 \times 10^8 \text{ m/s}$) e λ é o comprimento de onda da luz em metros. A energia de um fóton de luz visível varia de 150 kJ/einstein para a luz vermelha até $\sim 300 \text{ kJ/einstein}$ para a luz violeta.

PROBLEMA 20-1 A energia de um fóton

A luz utilizada pelas plantas vasculares para a fotossíntese tem um comprimento de onda de cerca de 700 nm. Calcule a energia em um “mol” de fótons (um einstein) de luz desse comprimento de onda e compare com a energia necessária para sintetizar um mol de ATP.

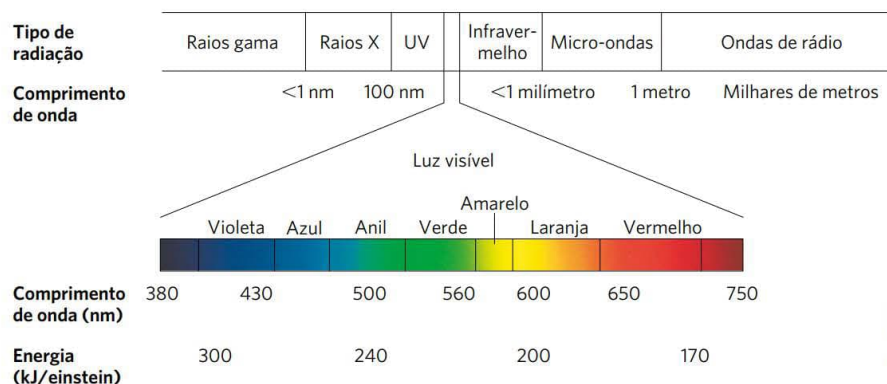


FIGURA 20-7 Radiação eletromagnética. O espectro da radiação eletromagnética e a energia de fótons na faixa do visível. Um einstein é $6,022 \times 10^{23}$ fótons.

Solução: A energia em um único fóton é dada pela equação de Planck. Em um comprimento de onda de 700×10^{-9} m, a energia de um fóton é

$$\begin{aligned}
 E &= hc/\lambda \\
 &= [(6,626 \times 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s})(3,00 \times 10^8 \text{ m/s})] \\
 &\quad (7,00 \times 10^{-7} \text{ m}) \\
 &= 2,84 \times 10^{-19} \text{ J}
 \end{aligned}$$

Um einstein de luz é o número de Avogadro de fótons ($6,022 \times 10^{23}$); assim, a energia de um einstein de fótons a 700 nm é dada por

$$\begin{aligned}
 (2,84 \times 10^{-19} \text{ J/fóton})(6,022 \times 10^{23} \text{ fótons/einstein}) \\
 = 17,1 \times 10^4 \text{ J/einstein} \\
 = 171 \text{ kJ/einstein}
 \end{aligned}$$

Desse modo, um “mol” de fótons de luz vermelha tem cerca de cinco vezes a energia necessária para produzir um mol de ATP a partir de ADP e P_i (30,5 kJ/mol).

Quando um fóton é absorvido, um elétron na molécula que absorve (cromóforo) é elevado para um nível de maior energia. Esse é um evento “tudo ou nada”; para ser absorvido, o fóton precisa conter a quantidade de energia (um **quantum**) que se ajusta exatamente à energia da transição eletrônica. Uma molécula que absorveu um fóton está em um **estado excitado**, que geralmente é instável. Um elétron elevado a um orbital de maior energia em geral retorna rapidamente ao seu orbital de menor energia; a molécula excitada decai para o **estado basal** estável, liberando o quantum absorvido na forma de luz ou calor ou utilizando-o para realizar trabalho químico. A emissão de luz que acompanha o decaimento de moléculas excitadas (chamada de **fluorescência**) está sempre em um comprimento de onda maior (menor energia) do que aquele da luz absorvida (ver Quadro 12-2). Um modo alternativo de decaimento, de importância fundamental para a fotossíntese, envolve a transferência direta de energia de excitação de uma molécula excitada para uma molécula vizinha. Da mesma forma que o fóton é um quantum de energia luminosa, o **éxciton** é um quantum de energia passada de uma molécula excitada para outra molécula, no processo chamado de **transferência de éxciton**.

As clorofilas absorvem energia luminosa para a fotossíntese

Os pigmentos absorvedores de luz mais importantes nas membranas tilacoides são as **clorofilas**, pigmentos verdes com estruturas policíclicas, planares, lembrando a protoporfirina da hemoglobina (ver Figura 5-1), exceto que o Mg^{2+} , e não o Fe^{2+} , ocupa a posição central (**Figura 20-8a**). Os quatro átomos de nitrogênio orientados para dentro da clorofila estão coordenados com o Mg^{2+} . Todas as clorofilas têm uma longa cadeia lateral de **fitol**, esterificada a um grupo carboxila substituinte no anel IV, e as clorofilas também têm um quinto anel de cinco membros, ausente no heme.

O sistema heterocíclico de cinco anéis que circunda o Mg^{2+} tem uma estrutura estendida de polieno, com ligações simples e duplas alternadas. Os polienos mostram, caracteristicamente, forte absorção na região visível do espectro (**Figura 20-9**); as clorofilas têm coeficientes de extinção molar excepcionalmente altos (ver Quadro 3-1), sendo, portanto, particularmente bem aptas a absorver a luz visível durante a fotossíntese.

Os cloroplastos sempre contêm tanto clorofila *a* quanto clorofila *b* (Figura 20-8a). Embora ambas sejam verdes, os seus espectros de absorção são suficientemente diferentes (Figura 20-9), de modo a complementarem a faixa de absorção de luz uma da outra na região visível. A maioria das plantas contém duas vezes mais clorofila *a* do que clorofila *b*. Os pigmentos em algas e em bactérias fotossintéticas incluem clorofilas que diferem apenas levemente dos pigmentos das plantas.

As cianobactérias e as algas vermelhas utilizam **ficobilinas** como ficoeritrobilina e ficocianobilina (Figura 20-8b) como seus pigmentos de captura de luz. Esses tetrapirróis de cadeia aberta têm o sistema de polieno estendido encontrado nas clorofilas, mas não sua estrutura cíclica e seu Mg^{2+} central. As ficobilinas são ligadas covalentemente a proteínas específicas de ligação, formando **ficobiliproteínas**, que se associam em complexos altamente ordenados, chamados de ficobilissomos, que constituem as estruturas primárias de coleta de luz nesses microrganismos.

Os pigmentos acessórios ampliam a faixa de absorção de luz

Além das clorofilas, as membranas tilacoides contêm pigmentos secundários de absorção de luz, ou **pigmentos**

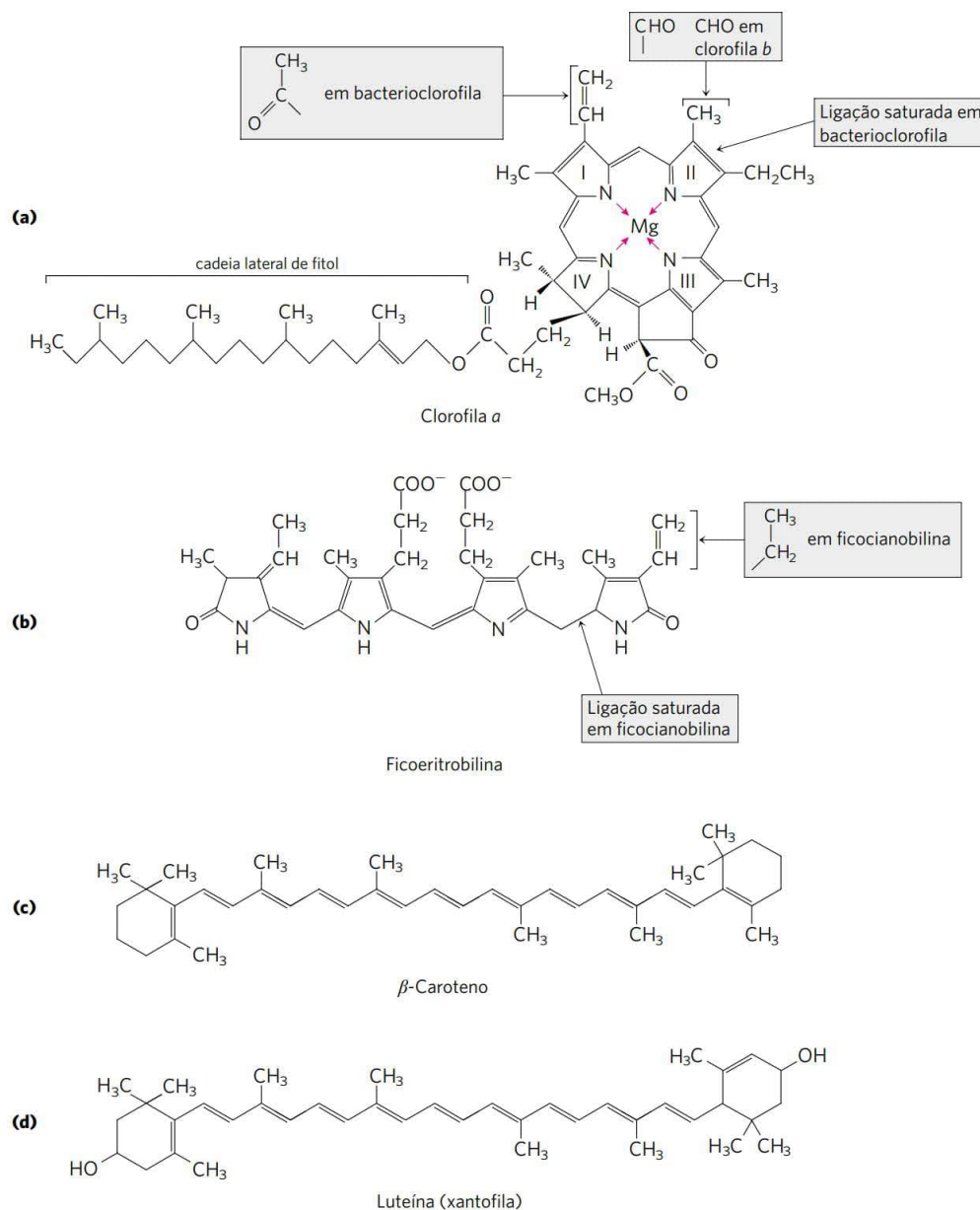


FIGURA 20-8 Fotopigmentos primários e secundários. (a) Clorofilas *a* e *b* e bacterioclorofila são os coletores primários de energia luminosa. (b) Ficoeritrobilina e ficocianobilina (ficobilinas) são os pigmentos-antena em cianobactérias e algas vermelhas. (c) β-Caroteno (um carotenoide) e (d) luteína (uma xantofila) são pigmentos acessórios em plantas. Os sistemas conjugados (ligações simples e duplas alternadas) nestas moléculas são os grandes responsáveis pela absorção da luz visível.

acessórios, chamados de carotenoides. Os **carotenoides** podem ser de cor amarela, vermelha ou púrpura. Os mais importantes são o **β-caroteno**, um isoprenoide laranja-avermelhado, e o carotenoide amarelo **luteína** (Figura 20-8c, d). Os pigmentos carotenoides absorvem luz em comprimentos de onda não absorvidos pelas clorofilas (Figura 20-9), sendo assim receptores de luz suplementares. Eles também protegem componentes a jusante no processo de uma forma de oxigênio altamente reativa (o oxigênio *singlet*), formada quando a intensidade da luz excede a capacidade do sistema de aceitar elétrons.

A determinação experimental da efetividade da luz de diferentes cores em promover a fotossíntese gera um **espectro de ação** (Figura 20-10), normalmente útil na identificação do pigmento primariamente responsável por um efeito biológico da luz. Captando luz na região do espectro não utilizada por outros organismos, um organismo fotossintético pode ocupar um nicho ecológico singular. Por exemplo, as ficobilinas nas algas vermelhas e nas cianobactérias absorvem luz na faixa de 520 a 630 nm (Figura 20-9), o que permite que ocupem nichos nos quais a luz de comprimentos de onda mais baixos ou mais altos foi captada pelos

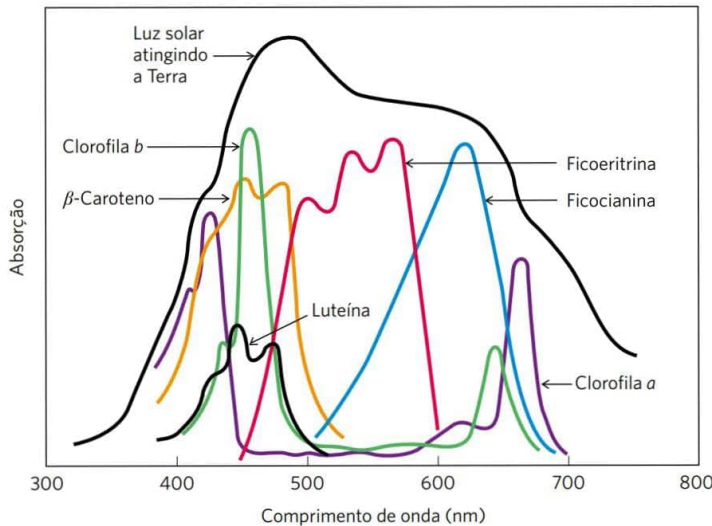


FIGURA 20-9 Absorção de luz visível por fotopigmentos. As plantas são verdes porque seus pigmentos absorvem luz das regiões azul e vermelha do espectro, deixando principalmente a luz verde para ser refletida. Compare os espectros de absorção dos pigmentos com o espectro da luz solar que chega na superfície da terra; a combinação de clorofilas (*a* e *b*) e pigmentos acessórios possibilita às plantas coletar a maior parte da energia disponível na luz solar.

As quantidades relativas de clorofilas e pigmentos acessórios são características de uma espécie vegetal em particular. A variação na proporção desses pigmentos é responsável pela gama de cores dos organismos fotossintéticos, do profundo verde azulado das acículas de abeto, ao verde mais verde das folhas de plátano, à cor vermelha, marrom ou púrpura de algumas espécies multicelulares de algas e das folhas de algumas folhagens cultivadas por jardineiros.

pigmentos de outros organismos que vivem na água acima delas ou pela própria água.

A clorofila canaliza a energia absorvida para os centros de reação pela transferência de éxcitons

Os pigmentos absorvedores de luz das membranas tilacoides ou bacterianas estão arranjados em estruturas funcionais, denominadas **fotossistemas**. Em cloroplastos de es-

pináfere, por exemplo, cada fotossistema contém cerca de 200 moléculas de clorofila e 50 de carotenoides. Todas as moléculas de pigmentos em um fotossistema podem absorver fótons, mas apenas poucas moléculas de clorofila associadas ao **centro de reação fotoquímica** são especializadas na transdução de luz em energia química. As demais moléculas de pigmentos em um fotossistema servem como **moléculas-antena**. Elas absorvem a energia luminosa e a transmitem de modo rápido e eficiente ao centro de reação (**Figura 20-11**). Algumas são parte de um complexo central situado ao redor do centro de reação, outras formam **complexos de captação de luz (LHC)** na periferia do complexo central. Clorofila e outros pigmentos estão sempre associados com proteínas de ligação específicas, que fixam os cromóforos uns em relação aos outros, em relação a outros complexos de proteínas e à membrana. Por exemplo, cada monômero do complexo coletor de luz trimérico LHCII (**Figura 20-12**) contém sete moléculas de clorofila *a*, cinco de clorofila *b* e duas de luteína.

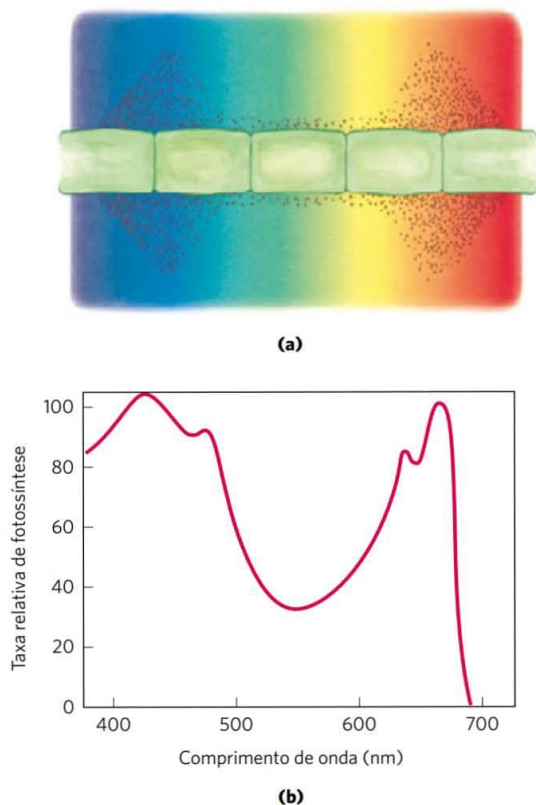


FIGURA 20-10 Duas formas de determinar o espectro de ação para a fotossíntese. (a) Resultados de um experimento clássico realizado por T. W. Engelmann em 1882 para determinar o comprimento de onda da luz mais efetivo em sustentar a fotossíntese. Engelmann colocou células de uma alga fotossintética filamentosa em uma lâmina de microscópio e a iluminou com a luz de um prisma, de modo que parte do filamento recebia principalmente luz azul, outra parte, amarela e outra, vermelha. Para determinar quais as células da alga que realizavam fotossíntese mais ativamente, Engelmann também colocou sobre a lâmina de microscópio bactérias conhecidas por migrar em direção a regiões de alta concentração de O_2 . Depois de um período de iluminação, a distribuição das bactérias mostrou os maiores níveis de O_2 (produzido pela fotossíntese) nas regiões iluminadas com luz violeta e vermelha.

(b) Resultados de um experimento similar que usou técnicas modernas (eletrodo de oxigênio) para medir a produção de O_2 . Um espectro de ação (como mostrado aqui) descreve a taxa relativa de fotossíntese para a iluminação com um número constante de fótons de diferentes comprimentos de onda. Um espectro de ação é útil porque, pela comparação com espectros de absorção (como aqueles na Figura 20-9), ele sugere quais pigmentos podem canalizar energia para a fotossíntese.

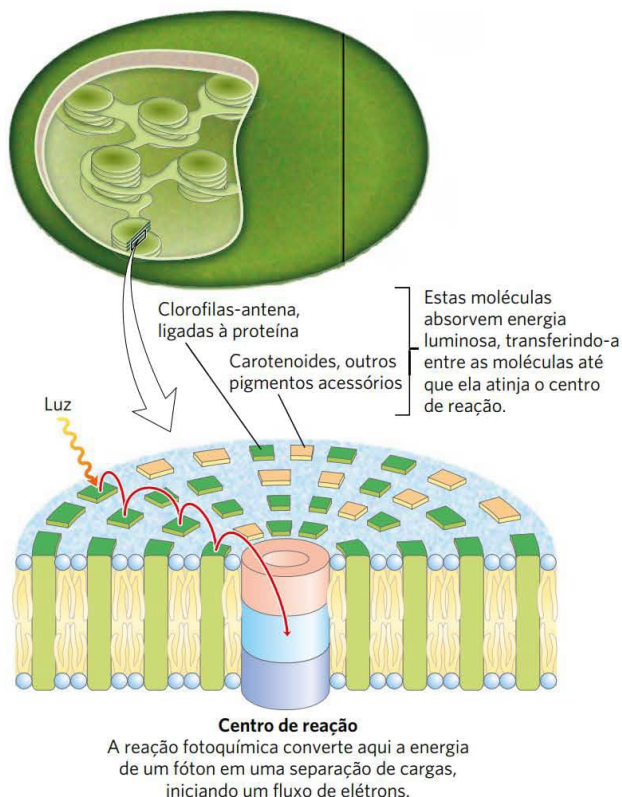


FIGURA 20-11 Organização dos fotossistemas nas membranas tilacoides. Os fotossistemas estão firmemente empacotados na membrana tilacoide, com várias centenas de clorofilas do tipo antena e pigmentos acessórios circundando um centro de fotoreação. A absorção de um fóton por qualquer uma das clorofilas-antena leva à excitação do centro de reação por transferência de éxcitons (seta vermelha). Também embebidos na membrana tilacoide estão o complexo de citocromos b_6f e a ATP-sintase (ver Figura 20-21).

As moléculas de clorofila nos complexos coletores de luz e outras proteínas de ligação a clorofilas têm propriedades de absorção de luz que são sutilmente diferentes daquelas da clorofila livre. Quando moléculas de clorofila isoladas *in vitro* são excitadas pela luz, a energia absorvida é rapidamente liberada como fluorescência e calor, mas quando a clorofila em folhas intactas é excitada pela luz visível (**Figura 20-13**, etapa 1), muito pouca fluorescência é observada. Em vez disso, a clorofila excitada que funciona como antena molecular transfere energia diretamente a uma molécula de clorofila vizinha, a qual se torna excitada à medida que a primeira molécula retorna ao seu estado basal (etapa 2). Essa transferência de energia, a transferência de éxciton, estende-se a uma terceira, quarta ou subsequente vizinha, até que uma de um par especial de moléculas de clorofila a no centro de reação fotoquímico seja excitada (etapa 3). Nessa molécula excitada de clorofila, um elétron é promovido a um orbital de maior energia. Esse elétron passa, então, a um aceptor de elétrons próximo, que é parte da cadeia de transporte de elétrons, deixando a clorofila do centro de reação com um elétron a

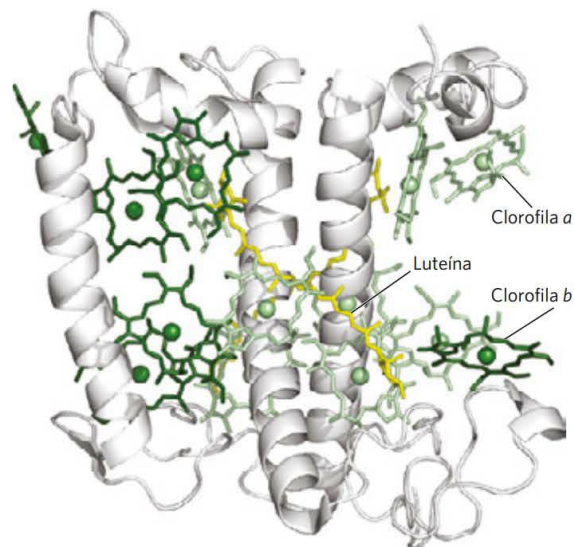


FIGURA 20-12 O complexo coletor de luz, LHCII. A unidade funcional é um trímero, com 36 moléculas de clorofila e de luteína. Ilustrado aqui está um monômero, visto no plano da membrana, com seus três segmentos α -helicoidais transmembrana, sete moléculas de clorofila a (em verde-claro), cinco moléculas de clorofila b (em verde-escuro) e duas moléculas do pigmento acessório luteína (em amarelo), que formam uma bráçadeira interna em cruz. [Fonte: PDB ID 2BHW, J. Standfuss et al., *EMBO J.* 24:919, 2005.]

menos (um “buraco eletrônico”, indicado por + na Figura 20-13) (etapa 4). O aceptor de elétrons adquire uma carga negativa nessa transação. O elétron perdido pela clorofila do centro de reação é reposto por um elétron de uma molécula doadora de elétrons vizinha (etapa 5), a qual, então, torna-se positivamente carregada. Dessa forma, a excitação pela luz causa separação de cargas elétricas e inicia uma cadeia de oxidação-redução.

RESUMO 20.1 Absorção de luz

- A fotossíntese ocorre nos cloroplastos de algas e plantas, estruturas delimitadas por membranas duplas e preenchidas com um sistema elaborado de membranas tilacoides, que contêm a maquinaria fotossintética.
- As reações luminosas da fotossíntese são aquelas que dependem diretamente da absorção de luz; a fotoquímica resultante retira elétrons da H_2O e direciona-os por meio de uma série de carreadores ligados à membrana, produzindo NADPH e ATP.
- Um fóton de luz visível tem energia suficiente para desencadear reações fotoquímicas que, em organismos fotossintéticos, acabam levando à síntese de ATP.
- Moléculas de clorofila estão associadas a proteínas nos complexos coletores de luz, os quais estão arranjados ao redor de centros fotoquímicos de reação.
- Nas reações de luz das plantas, a absorção de um fóton excita as moléculas de clorofila e outros pigmentos (acessórios), os quais canalizam a energia para os cen-

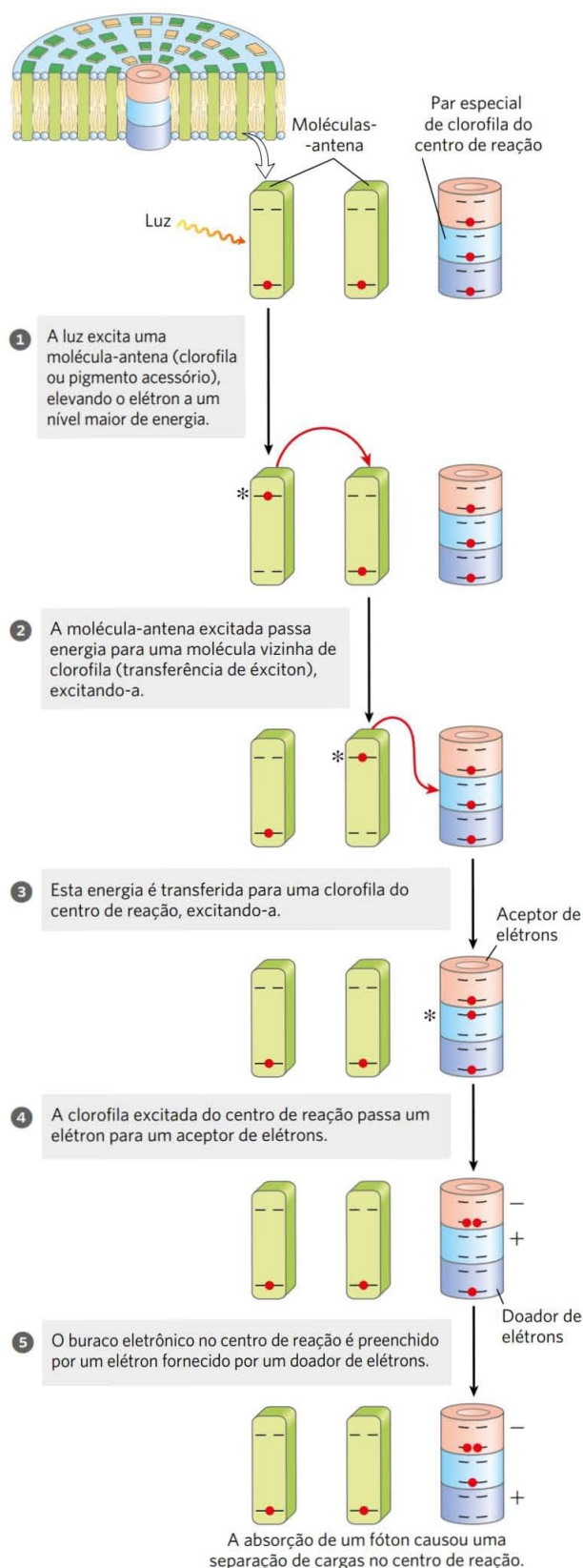


FIGURA 20-13 Éxciton e transferência de elétrons. Este esquema geral mostra a conversão da energia de um fóton absorvido na separação de cargas no centro de reação. As etapas estão descritas detalhadamente no texto. Observe que a etapa 1 pode ser repetida entre moléculas-antena sucessivas, até que o éxciton atinja o par de clorofilas no centro reacional. Um asterisco (*) denota o estado excitado de uma molécula.

tros de reação nas membranas tilacoides. Nos centros de reação, a fotoexcitação resulta em uma separação de cargas que produz um forte doador de elétrons (agente redutor) e um forte aceptor de elétrons.

20.2 Centros de reações fotoquímicas

A determinação do sítio e da natureza da química fotodependente na fotossíntese mostrou-se um grande desafio. Uma razão para essa dificuldade foi a insolubilidade do aparato fotossintético; as peças-chave são proteínas integrais de membrana e, como a maioria das proteínas de membrana, sua solubilização e purificação é bastante difícil. Uma importante contribuição surgiu em 1952, quando Louis Duysens verificou que a iluminação de membranas fotossintéticas da bactéria púrpura *Rhodospirillum rubrum* com um pulso de luz de um comprimento de onda específico (870 nm) causava um decréscimo temporário na absorção de luz naquele comprimento de onda; um pigmento era “descolorado” por luz de 870 nm. Estudos posteriores de Bessel Kok e Horst Witt mostraram descoloração similar de pigmentos de cloroplastos vegetais por luz de 680 e 700 nm. Além disso, a adição do aceptor de elétrons (não biológico) $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (ferricianeto) causou a descoloração nestes comprimentos de onda *sem iluminação*. Esses achados indicaram que a descoloração de pigmentos se devia à perda de um elétron de um centro de reação fotoquímico. Os pigmentos foram denominados de acordo com o comprimento de onda de maior descoloração: P870, P680 e P700. Posteriormente, foi descoberto que esses pigmentos eram um “par especial” de moléculas de clorofila no centro de reação, frequentemente designado $(\text{Clo})_2$.

Bactérias fotossintéticas têm dois tipos de centro de reação

As bactérias fotossintéticas têm uma maquinaria de fototransdução relativamente simples, com um de dois tipos gerais de centros de reação. Um tipo (encontrado em bactérias púrpuras) passa elétrons por meio da **feofitina** (clorofila sem o íon central de Mg^{2+}) para uma quinona. O outro tipo (em bactérias verdes sulfurosas) passa elétrons por meio de uma quinona para um centro de ferro-enzofre. As cianobactérias e as plantas têm dois fotossistemas (PSI e PSII), um de cada tipo, atuando em sequência. Estudos bioquímicos e biofísicos revelaram muitos dos detalhes moleculares dos centros de reação das bactérias e das cianobactérias, servindo, assim, como protótipos para o sistema mais complexo de fototransdução das plantas.

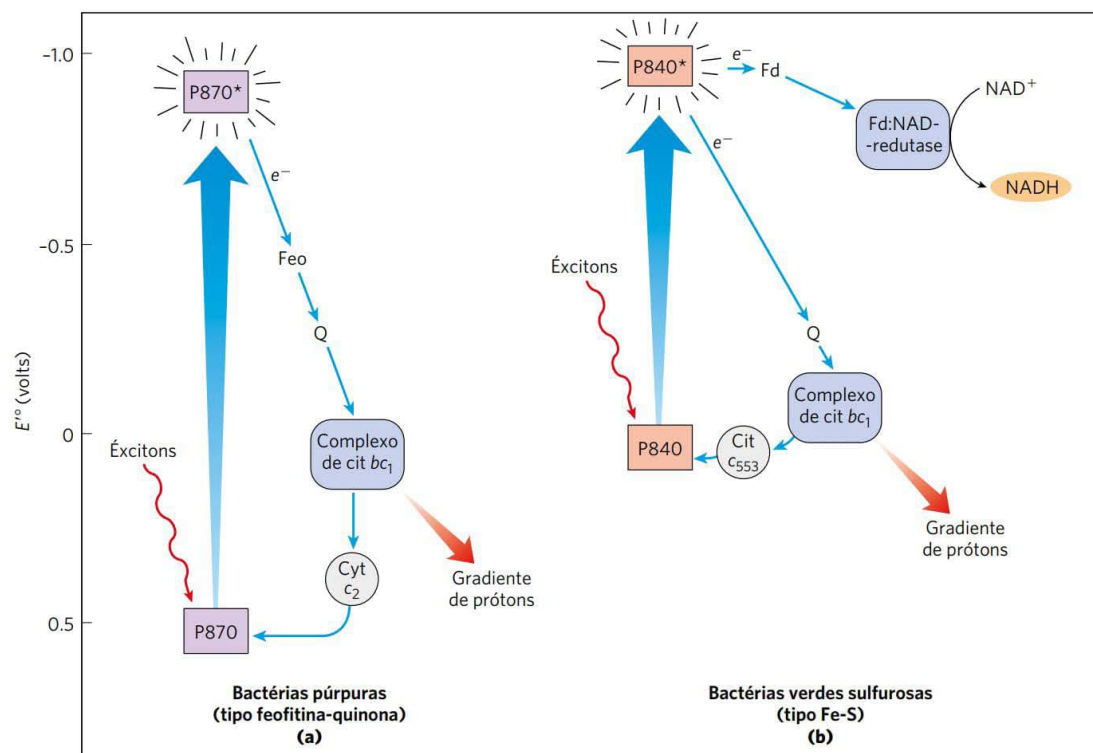


FIGURA 20-14 Módulos funcionais da maquinaria fotossintética em bactérias púrpuras e bactérias verdes sulfurosas. **(a)** Em bactérias púrpuras, a energia da luz impulsiona os elétrons do centro de reação P870 através da feofitina (Feo), de uma quinona (Q) e do complexo de citocromos bc_1 , seguindo pelo citocromo c_2 e então de volta ao centro de reação. O fluxo de elétrons pelo complexo de citocromos bc_1 causa o bombeamento de prótons, criando um potencial eletroquímico que permite a síntese de ATP. **(b)** As bactérias verdes sulfurosas têm duas vias para os elétrons impulsionados pela excitação do P840: uma via cíclica, por meio de uma quinona para o complexo de citocromos bc_1 e de volta ao centro de reação via citocromo c_{553} e uma via não cíclica, partindo do centro de reação, através da proteína ferro-enxofre ferredoxina (Fd) e, então, para o NAD^+ , em uma reação catalisada pela ferredoxina:NAD-reductase.

O centro de reação feofitina-quinona (centro de reação tipo II)

A maquinaria fotossintética em bactérias púrpuras consiste em três módulos básicos (**Figura 20-14**): um único centro de reação (P870), um complexo de transferência de elétrons, os citocromos bc_1 , similar ao complexo III da cadeia mitocondrial de transferência de elétrons, e uma ATP-sintase, também similar àquela das mitocôndrias. A iluminação impulsiona os elétrons através da feofitina e de uma quinona para o complexo de citocromos bc_1 . Depois de passarem pelo complexo, os elétrons fluem pelo citocromo c_2 de volta ao centro de reação, restabelecendo o seu estado pré-iluminação. Esse fluxo cíclico de elétrons promovido pela luz fornece a energia para o bombeamento de prótons pelo complexo de citocromos bc_1 . Usando a energia do gradiente de prótons resultante, a ATP-sintase produz ATP, exatamente como na mitocôndria (ver Figura 19-26).

As estruturas tridimensionais dos centros de reação das bactérias púrpuras (*Rhodospseudomonas viridis* e *Rhodobacter sphaeroides*), deduzidas a partir da cristalografia por raios X, esclareceu como ocorre a fototransdução em um centro de reação feofitina-quinona. O centro de reação de *R. viridis* (**Figura 20-15a**) é um grande complexo pro-

teico que contém quatro subunidades de polipeptídeos, dois pares de bacterioclorofilas, um par de feofitinas, duas quinonas, um ferro não heme e quatro hemes no citocromo tipo c associado.

A sequência extremamente rápida de transferências de elétrons mostrada na Figura 20-15b foi deduzida a partir de estudos físicos dos centros feofitina-quinona bacterianos, usando breves flashes de luz para desencadear a fototransdução e uma variedade de técnicas espectroscópicas para acompanhar o fluxo de elétrons através de vários carreadores. Um par de moléculas de bacterioclorofila a (Clo_2) – o “par especial” – constitui o P870, o sítio inicial da fotoquímica no centro de reação bacteriano. A energia de um fóton absorvido por uma das muitas moléculas de clorofila-antena que circundam o centro de reação atinge o P870 por transferência de excítons. Quando essas duas moléculas de bacterioclorofila – tão próximas que seus orbitais de ligação se sobrepõem – absorvem um excíton, o potencial *redox* do P870 é deslocado em uma quantidade equivalente à energia do fóton, convertendo o par especial em um doador de elétrons muito forte. O P870 doa um elétron que passa por meio de um monômero de clorofila vizinho para a feofitina (Feo). Isso produz dois radicais,

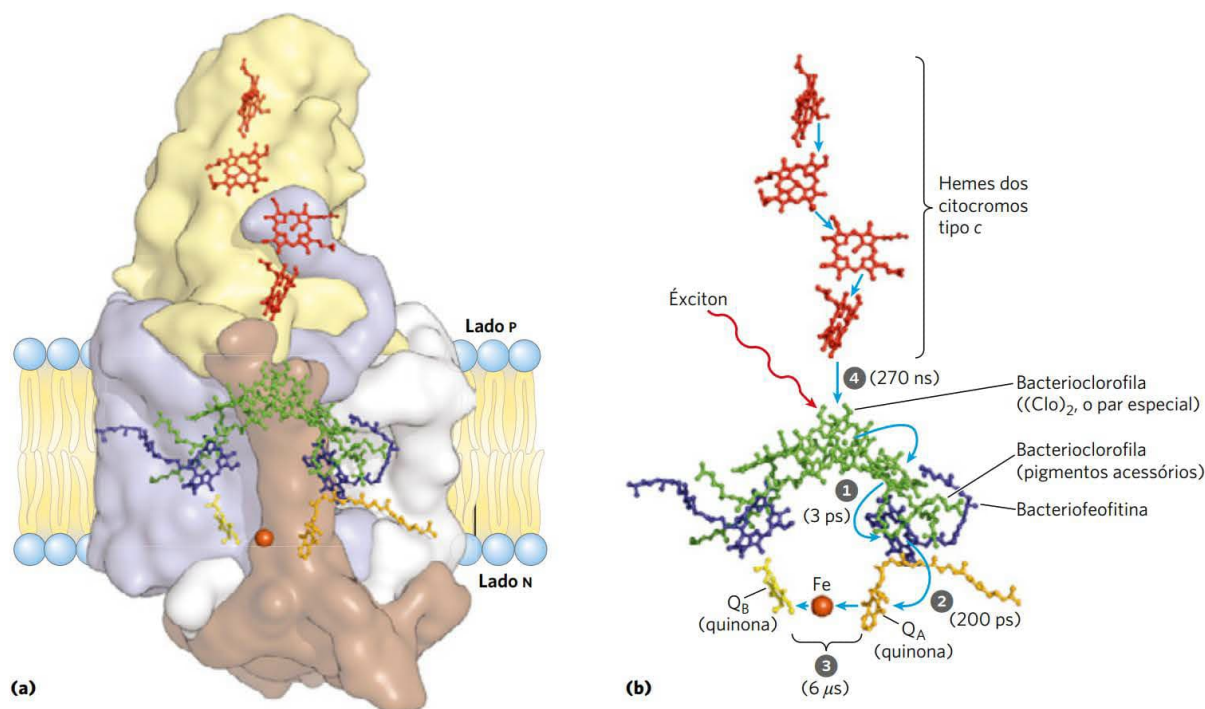
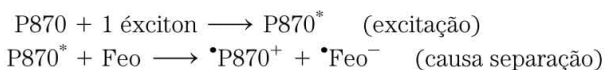


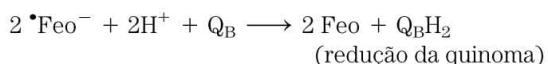
FIGURA 20-15 Centro de reação fotoquímica da bactéria púrpura *Rhodospseudomonas viridis*. (a) O sistema tem quatro componentes: três subunidades, H, M e L (em marrom, azul e branco, respectivamente), com um total de 11 segmentos de hélices transmembrana, e uma quarta proteína, citocromo c (em amarelo), associada com o complexo na superfície da membrana. As subunidades L e M são proteínas transmembrana pareadas, que, juntas, formam uma estrutura cilíndrica com simetria grosseiramente bilateral por toda a extensão de seu eixo longo. Mostrados na superfície em (a) e separadamente em (b) estão modelos de esferas e bastões dos grupos prostéticos participantes dos eventos fotoquímicos. Ligados às cadeias L e M estão os dois pares de moléculas de bacterioclorofilas (em verde); um dos pares – o “par especial” ($(\text{Clo})_2$) – é o P870, sítio das primeiras mudanças fotoquímicas após a absorção da luz. Também incorporados no sistema estão um par de moléculas de feofitina *a* (Feo *a*) (em azul); duas quinonas, menaquinona (Q_A) e ubiquinona (Q_B) (em cor de laranja e amarelo), também arranjadas com simetria bilateral; e um único Fe não heme (em vermelho), localizado aproximadamente no eixo de simetria entre as quinonas. Mostrados na parte superior da figura estão quatro grupos heme (em vermelho), associados com o citocromo tipo c do centro de reação.

(b) Sequência de eventos que seguem a excitação do par especial de bacterioclorofilas, com a escala de tempo das transferências de elétrons entre parênteses. ① O par especial excitado passa um elétron, através de um monômero de bacterioclorofila, para a feofitina, ② de onde o elétron rapidamente se move até a menaquinona (Q_A) fortemente ligada. ③ Esta quinona passa elétrons muito mais lentamente à ubiquinona difusível, Q_B , por meio do Fe não heme. Enquanto isso, ④ o “buraco eletrônico” no par especial é preenchido por um elétron do heme do citocromo c. [Fonte: PDB ID 1PRC, J. Drenth et al., *J. Mol. Biol.* 246:429, 1995.]

um positivamente carregado (o par especial de clorofilas, P870) e um negativamente carregado (a feofitina):



O radical feofitina passa agora o seu elétron para uma molécula de quinona ligada firmemente (Q_A), convertendo-a em um radical semiquinona, que imediatamente doa o seu elétron extra para uma segunda quinona, ligada frouxamente (Q_B). Duas transferências de elétrons desse tipo convertem Q_B em sua forma totalmente reduzida, $\text{Q}_\text{B}\text{H}_2$, que está livre para se difundir na bicamada da membrana, afastando-se do centro de reação:



A hidroquinona ($\text{Q}_\text{B}\text{H}_2$), carregando em suas ligações químicas parte da energia dos fótons que originalmente excitaram P870, ingressa no conjunto (*pool*) de quinonas reduzidas (QH_2) dissolvido na membrana e move-se pela fase lipídica da bicamada para o complexo de citocromos bc_1 .

Da mesma forma que o homólogo complexo III nas mitocôndrias, o complexo de citocromos bc_1 das bactérias púrpuras carrega elétrons de um doador quinol (QH_2) para um aceptor de elétrons, usando a energia da transferência de elétrons para bombear prótons através da membrana, produzindo uma força próton-motriz. Acredita-se que a via do fluxo de elétrons por este complexo seja muito semelhante àquela pelo complexo III mitocondrial, envolvendo um ciclo Q (Figura 19-11), no qual prótons são consumidos em um lado da membrana e liberados no outro. O aceptor final de elétrons em bactérias púrpuras é a forma deficitária de elétrons de P870, P870^+ . Os elétrons movem-se do comple-

xo de citocromos bc_1 para o P870 através de um citocromo tipo c solúvel, citocromo c_2 (Figura 20-14a). O processo de transferência de elétrons completa o ciclo, devolvendo o centro de reação ao seu estado não decorado, pronto para absorver outro éxciton das clorofilas-antena.

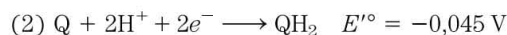
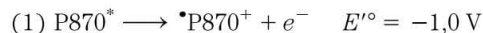
Uma característica notável desse sistema é que toda a química ocorre no *estado sólido*, com espécies reativas mantidas próximas umas das outras na orientação correta para a reação. O resultado é uma série de reações muito rápidas e eficientes.

O centro de reação Fe-S (centro de reação tipo I) A fotossíntese em bactérias verdes sulfurosas envolve os mesmos três módulos das bactérias púrpuras, mas o processo difere em vários aspectos e envolve reações enzimáticas adicionais (Figura 20-14b). A excitação faz um elétron se mover do centro de reação ao complexo de citocromos bc_1 através de uma quinona carreadora. A transferência de elétrons por esse complexo fornece energia para o transporte de prótons e cria a força próton-motriz usada para a síntese de ATP, da mesma forma que em bactérias púrpuras e mitocôndrias. No entanto, ao contrário do fluxo cíclico de elétrons nas bactérias púrpuras, alguns elétrons fluem do centro de reação para uma proteína ferro-enxofre, **ferredoxina**, que, então, passa elétrons via **ferredoxina:NAD-redutase** para o NAD^+ , produzindo NADH. Os elétrons retirados do centro de reação para reduzir o NAD^+ são repostos pela oxidação de H_2S a S elementar e, então, a SO_4^{2-} , em uma reação que define as bactérias verdes sulfurosas. A oxidação de H_2S por bactérias é quimicamente análoga à oxidação da água em plantas oxigênicas.

Fatores cinéticos e termodinâmicos impedem a dissipação da energia por conversão interna

A construção complexa dos centros de reação é o produto da seleção evolutiva visando à eficiência do processo fotossintético. O estado excitado $P870^*$ poderia, a princípio, decair para seu estado basal por conversão interna, um processo muito rápido (10 picossegundos; $1\text{ ps} = 10^{-12}\text{ s}$), no qual a energia do fóton absorvido é convertida em calor (movimento molecular). Os centros de reação são construídos para impedir a ineficiência que resultaria da conversão interna. As proteínas dos centros de reação mantêm as bacterioclorofilas, bacteriofeofitinas e quinonas em uma orientação fixa em relação umas às outras. Isso explica a alta eficiência e rapidez das reações; não há margem para colisão ocasional e difusão aleatória. A transferência de éxcitons da clorofila-antena para o par especial do centro de reação é realizada em menos de 100 ps, com eficiência $> 90\%$. Dentro de 3 ps após a excitação de P870, a feofitina recebeu um elétron e tornou-se um radical negativamente carregado; menos de 200 ps mais tarde, o elétron atingiu a quinona Q_B (Figura 20-15b). As reações de transferência de elétrons não são apenas rápidas, mas, termodinamicamente, são “montanha abaixo”; o par especial excitado $P870^*$ é um doador de elétrons muito bom ($E'^{\circ} = -1\text{ V}$), e cada transferência sucessiva de elétrons é para um aceptor com E'° substancialmente menos negativo. Lembre-se, do Capítulo 13, que $\Delta G'^{\circ} = -n \Delta E'^{\circ}$; aqui,

$\Delta E'^{\circ}$ é a diferença entre os potenciais de redução padrão das duas hemirreações



Assim

$$\Delta E'^{\circ} = -0,045\text{ V} - (-1,0\text{ V}) \approx 0,95\text{ V}$$

e

$$\Delta G'^{\circ} = -2(96,5\text{ kJ/V}\cdot\text{mol})(0,95\text{ V}) = -180\text{ kJ/mol}$$

A combinação da cinética rápida e da termodinâmica favorável torna o processo praticamente irreversível e altamente eficiente. A produção global de energia (o percentual da energia do fóton conservada em QH_2) é $> 30\%$, com o restante da energia dissipado como calor e entropia.

Nas plantas, dois centros de reação agem em sequência

O aparato fotossintético de cianobactérias modernas, algas e plantas vasculares é mais complexo do que os sistemas bacterianos com apenas um centro e parece ter evoluído pela combinação de dois fotocentros bacterianos mais simples. As membranas tilacoides dos cloroplastos têm dois tipos diferentes de fotossistemas, cada um com seu próprio tipo de centro de reação fotoquímico e de conjunto de moléculas-antena. Os dois sistemas têm funções distintas e complementares (**Figura 20-16**). O **fotossistema II (PSII)** é um sistema do tipo feofitina-quinona (como o fotossistema único das bactérias púrpuras), contendo quantidades aproximadamente iguais de clorofilas a e b . A excitação do par especial P680 em seu centro de reação impulsiona os elétrons pelo complexo de citocromos b_6f , com movimento concomitante de prótons através da membrana tilacoide. O **fotossistema I (PSI)** está estrutural e funcionalmente relacionado ao centro de reação tipo I das bactérias verdes sulfurosas. Ele tem um centro de reação denominado P700 e uma alta razão entre clorofila a e clorofila b . O P700 excitado passa elétrons via uma cadeia de carreadores à proteína Fe-S ferredoxina e, então, para o $NADP^+$, produzindo NADPH. As membranas tilacoides de um único cloroplasto de espinafre têm muitas centenas de cada tipo de fotossistema.

Esses dois centros de reação em plantas agem em sequência para catalisar o movimento de elétrons promovido pela luz, de H_2O para $NADP^+$. Os elétrons são transportados entre os dois fotossistemas pela proteína solúvel **plastoquinona**. Para repor os elétrons que se movem do PSII, passando pelo PSI até chegar ao $NADP^+$, as cianobactérias e as plantas oxidam H_2O (da mesma forma que as bactérias verdes sulfurosas oxidam H_2S), produzindo O_2 (Figura 20-16, parte inferior, à esquerda). Esse processo é chamado de **fotossíntese oxigênica**, para distingui-lo da fotossíntese anoxigênica das bactérias púrpuras e verdes sulfurosas. Todas as células fotossintéticas que produzem O_2 – as das plantas, algas e cianobactérias – contêm tanto PSI quanto PSII; organismos com apenas um fotossistema não produzem O_2 . O diagrama na Figura 20-16, comumente chamado

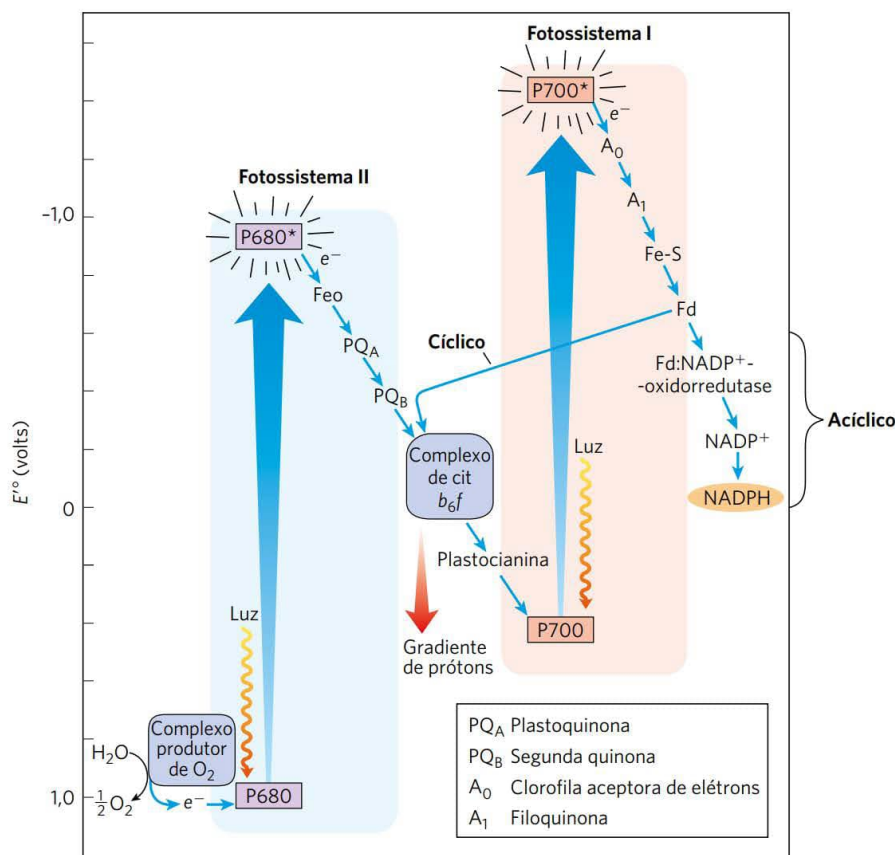
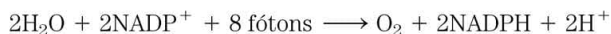


FIGURA 20-16 Integração dos fotossistemas I e II nos cloroplastos. Este “esquema Z” mostra a via da transferência de elétrons da água (parte inferior, à esquerda) para o NADP^+ (bem à direita) na fotossíntese acíclica. A posição na escala vertical de cada carreador de elétrons reflete seu potencial de redução padrão. Para aumentar a energia dos elétrons derivados da H_2O para o nível de energia requerido para reduzir o NADP^+ a NADPH , cada elétron precisa ter seu grau de energia mudado duas vezes (setas largas) por fótons absorvidos em PSII e PSI. É necessário um fóton por elétron em cada fotossistema. Depois da excitação, os elétrons de alta energia fluem “montanha abaixo” pelas cadeias de transporte ilustradas. Os prótons movem-se através da membrana tilacoide durante a reação de quebra da água e durante a transferência de elétrons pelo complexo de citocromos b_6f , produzindo o gradiente de prótons que é essencial para a formação de ATP. Uma via alternativa é a transferência cíclica de elétrons, na qual os elétrons se deslocam da ferredoxina de volta ao complexo de citocromos b_6f , em vez de reduzirem o NADP^+ a NADPH . A via cíclica produz mais ATP e menos NADPH do que a acíclica.

de **esquema Z** devido à sua forma geral, esboça a via de fluxo de elétrons entre os dois fotossistemas e as relações de energia nas reações fotodependentes. Assim, o esquema Z descreve a via completa pela qual os elétrons fluem da H_2O ao NADP^+ , de acordo com a equação



Para cada dois fótons absorvidos (um em cada fotossistema), um elétron é transferido da água ao NADP^+ . Para formar uma molécula de O_2 , que exige a transferência de quatro elétrons de duas moléculas de H_2O para dois NADP^+ , oito fótons precisam ser absorvidos no total, quatro em cada fotossistema.

Fotossistema II O PSII é dímérico (**Figura 20-17**). Cada monômero é um enorme complexo de 19 proteínas, incluindo o complexo central P680 de proteínas D1 e D2 do centro de reação; duas proteínas de ligação à clorofila, CP43 e CP47;

e cromóforos associados, incluindo carotenoides, um ferro não heme e o complexo inorgânico Mn_4CaO_5 . Dezesseis das proteínas de PSII apresentam segmentos transmembrana, mas três delas são proteínas periféricas localizadas no lado luminal, que estabiliza o complexo Mn_4CaO_5 . Cercando PSII estão proteínas adicionais de ligação à clorofila e complexos de captação de luz. Quando um próton é absorvido por uma dessas moléculas-antena, o éxciton resultante move-se rapidamente de um dos pigmentos a outro, até alcançar o centro de reação e excitar P680, o par especial de moléculas de clorofila *a* (Cloa)₂, para iniciar a fotoquímica (**Figura 20-18**).

Os detalhes do mecanismo das reações fotoquímicas em PSII são essencialmente similares àqueles do fotossistema das bactérias púrpuras, com diversas adições importantes. A excitação do P680 no PSII (**Figura 20-19**) produz P680^* , um excelente doador de elétrons que, em picossegundos, transfere um elétron para feofitina, conferindo a ela uma carga negativa (Feo^-). Com a perda de seu elétron, o P680^*

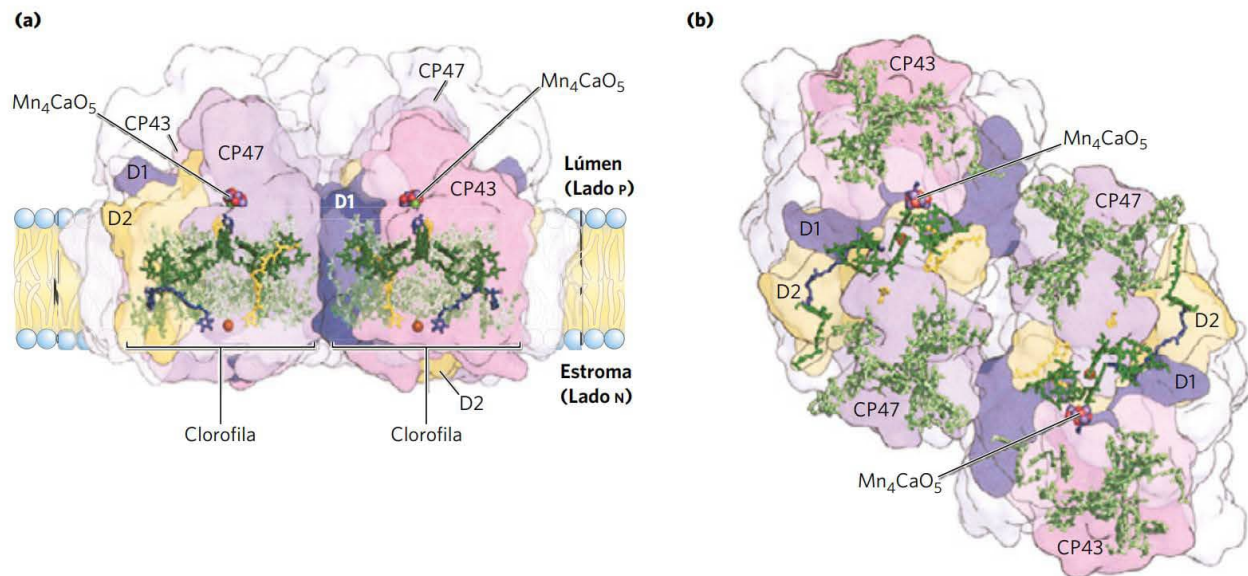
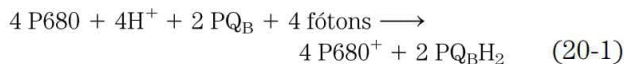


FIGURA 20-17 Estrutura do fotossistema II da cianobactéria *Thermosynechococcus vulcanus*. Esta estrutura, determinada por cristalografia por raios X, é vista **(a)** no plano da membrana e **(b)** a partir do lúmen tilacoide (lado P). Este enorme complexo é um dímero; cada monômero tem seu próprio centro de reação. CP43 e CP47 são proteínas ligadoras de clorofila que formam o núcleo da antena, diretamente associado às proteínas D1 e D2 do centro de reação de PSII. Cada monômero PSII contém 35 clorofilas, 2 feofitinas, 11 β -carotenos, 2 plastoquinonas, 1 citocromo do tipo *b* e 1 citocromo do tipo *c*, 1 ferro não heme e 1 complexo Mn_4CaO_5 . [Fonte: PDB ID 3WU2, Y. Umena et al., *Nature* 473:55, 2011.]

é transformado em um radical cátion, $P680^+$. $^{*}Feo^-$ passa seu elétron extra muito rapidamente a uma **plastoquinona** ligada à proteína, PQ_A (ou Q_A), que, por sua vez, passa seu

elétron a outra plastoquinona ligada mais frouxamente, PQ_B (ou Q_B). Quando PQ_B adquire dois elétrons de PQ_A em duas dessas transferências e dois prótons do solvente água, ela está em sua forma totalmente reduzida de quinol, PQ_BH_2 . A reação global iniciada pela luz no PSII é



Por fim, os elétrons em PQ_BH_2 passam pelo complexo de citocromos b_6f (Figura 20-16). O elétron inicialmente removido de $P680$ é substituído com um elétron obtido da oxidação da água, conforme descrito a seguir. O sítio de ligação para a plastoquinona é o ponto de ação de muitos herbicidas comerciais, que matam as plantas, bloqueando a transferência de elétrons pelo complexo de citocromos b_6f e impedindo a produção fotossintética de ATP.

Fotossistema I O PSI e suas moléculas-antena são parte de um complexo supramolecular composto de pelo menos 16 proteínas, incluindo quatro proteínas de ligação à clorofila arranjadas ao redor da periferia do centro de reação **(Figura 20-20)**. O complexo também inclui 35 carotenoides de diversos tipos, três núcleos 4Fe-4S, e duas filoquino-

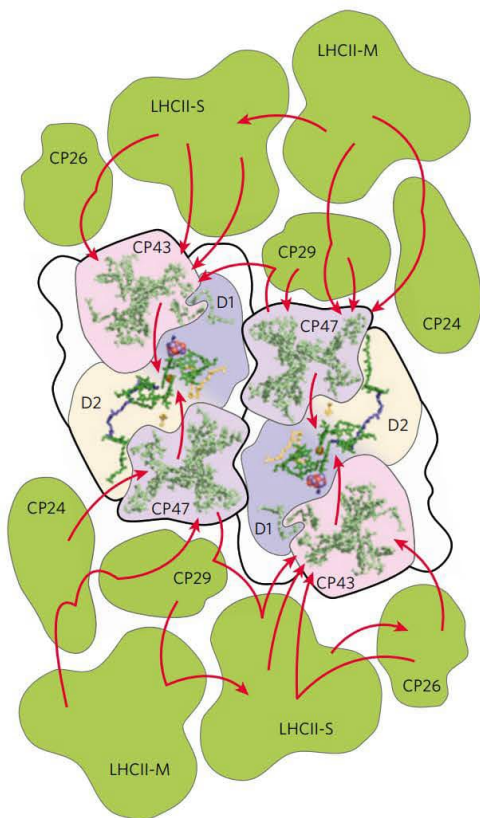


FIGURA 20-18 Via dos éxcitons através do fotossistema II. O centro de reação é cercado por diversos complexos-antena e está fracamente associado a eles. Cada um desses complexos contém muitas moléculas de clorofila e de outros pigmentos. CP43 e CP47 formam o núcleo da antena; CP26, CP29 e CP24 e os complexos triméricos captadores de luz LHCII-M e LHCII-S formam a antena externa. Quando um fóton excita uma dessas muitas clorofilas-antena, o éxciton resultante move-se (setas vermelhas) de clorofila a clorofila, até alcançar $P870$, o par especial de clorofilas do centro de reação nas proteínas transmembrana D1 e D2. [Fonte: PDB ID 3WU2, Y. Umena et al., *Nature* 473:55, 2011.]

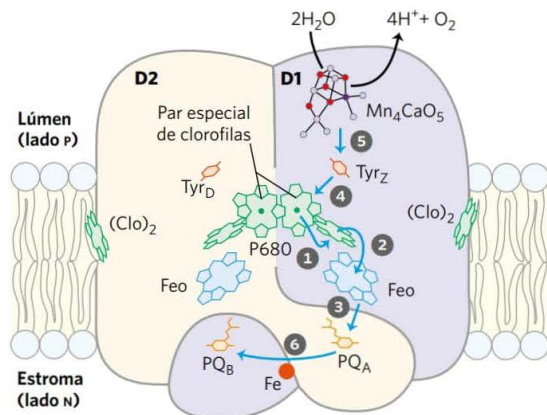


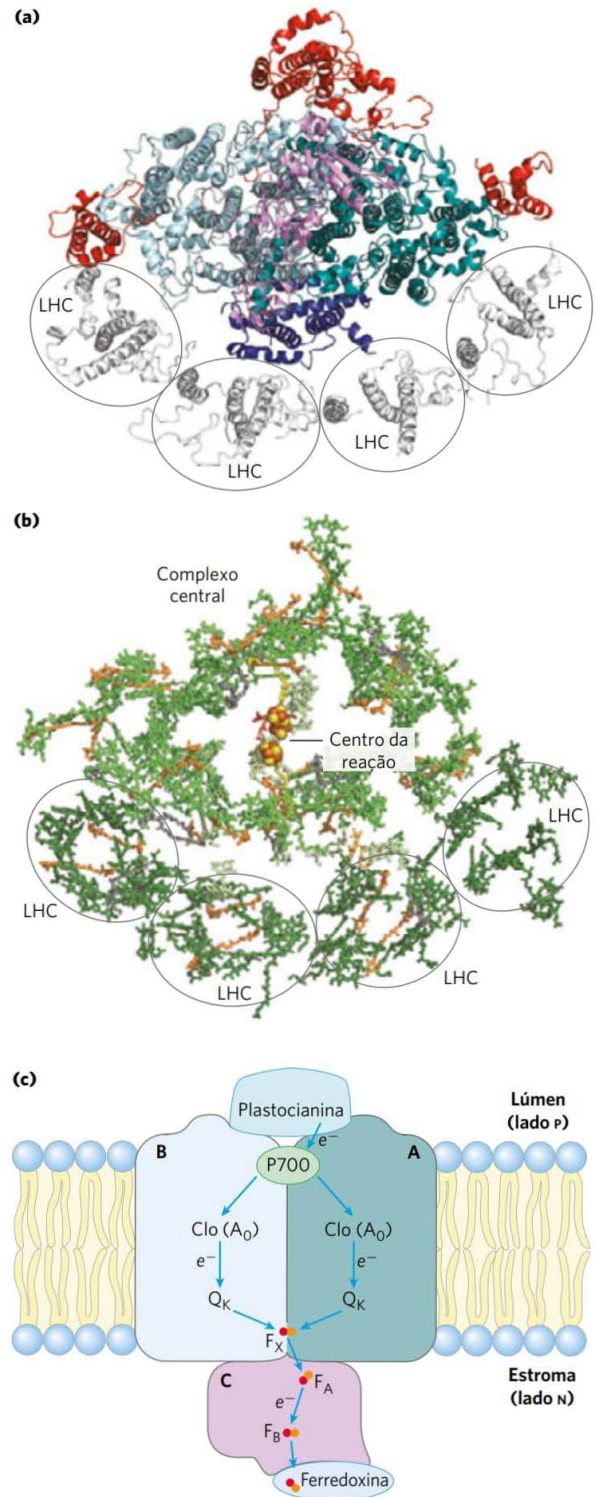
FIGURA 20-19 Fluxo de elétrons através do fotossistema II da cianobactéria *Synechococcus elongatus*. A forma monomérica do complexo mostrada aqui tem duas proteínas transmembrana principais, D1 e D2, cada uma com seu conjunto de carreadores de elétrons. Embora as duas subunidades sejam aproximadamente simétricas, o fluxo de elétrons ocorre apenas por um dos dois ramos de carreadores de elétrons, aquele à direita (em D1). As setas mostram a via do fluxo de elétrons do aglomerado de íons Mn_4CaO_5 da enzima que quebra a molécula de água até a plastoquinona PQ_B . Os eventos fotoquímicos ocorrem na sequência indicada pelos números das etapas. Observe a forte semelhança entre as posições dos cofatores transportadores de elétrons neste fotossistema e as posições no centro de fotoreação bacteriano mostrado na Figura 20-15. O papel dos resíduos de Tyr e a estrutura detalhada do aglomerado de íons Mn_4CaO_5 são discutidos mais adiante (ver Figura 20-24b).

nas. Os carreadores de elétrons do centro de reação estão firmemente integrados com as clorofilas-antena. Como resultado, a transferência de um éxciton das clorofilas-antena para o centro de reação é rápida e eficiente.

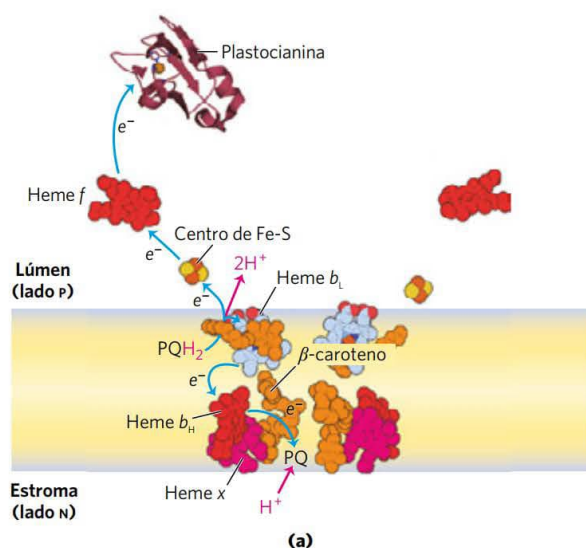
Os eventos fotoquímicos que seguem a excitação do PSI no centro de reação P700 (Figura 20-20c) são formalmente semelhantes àqueles no PSII. O P700* excitado no centro de reação perde um elétron para um aceptor, designado A_0 (uma molécula de clorofila a , funcionalmente homóloga à feofitina do PSII), criando A_0^- e P700⁺. Novamente, a excitação resulta em separação de cargas no centro de reação

FIGURA 20-20 Estrutura do fotossistema I de uma planta e fluxo de elétrons através do sistema. O fotossistema I é um trímero simétrico. Aqui, é mostrado um monômero do fotossistema I da ervilha, *Pisum sativum*, visto desde o lado do estroma em (a) e (b). (a) As subunidades proteicas do centro de reação e os complexos de captação de luz. (b) Os cromóforos. As moléculas de clorofila do complexo central são mostradas em verde-claro, aquelas do LHCI em verde-escuro e as clorofilas que se localizam na porção entre os complexos de captação de luz e o centro de reação em verde-oliva. Os lipídeos são mostrados em cinza e os carotenoides em cor de laranja. (c) O percurso dos elétrons (setas azuis) através de PSI, visto no plano da membrana. Quando P700, o par especial de clorofilas, é excitado por um fóton ou éxciton, seu potencial de redução é drasticamente reduzido, tornando-o um bom doador de elétrons. P700 passa, então, um elétron através de uma clorofila próxima (referida como A_0) para a filoquinona (Q_A). A filoquinona reduzida é reoxidada quando passa dois elétrons, um de cada vez, para um centro Fe-S (F_x) perto do lado N da membrana. De F_x , os elétrons movem-se por mais dois centros de Fe-S (F_A e F_B) para a proteína Fe-S ferredoxina no estroma. A ferredoxina, então, doa elétrons para o NADP⁺ (não mostrado), reduzindo-o a NADPH, uma das formas nas quais a energia dos fótons é aprisionada nos cloroplastos. [Fonte: (a, b) PDB ID 4RKU, Y. Mazor et al.]

fotoquímica. P700⁺ é um agente oxidante forte, que rapidamente adquire um elétron da plastocianina, uma proteína solúvel transferidora de elétrons que contém Cu. A_0^- é um agente redutor excepcionalmente forte, que passa seu elétron através de uma cadeia de carreadores que leva ao NADP⁺ (Figura 20-16, lado direito). A **filoquinona** (Q_K)



aceita o elétron e o passa para uma proteína ferro-enxofre via três centros Fe-S no PSI. A seguir, o elétron move-se até a ferredoxina (Fd), outra proteína ferro-enxofre frouxamente associada à membrana tilacoide. Lembre-se de que a ferredoxina contém um centro de 2Fe-2S (ver Figura 19-5) capaz de sofrer reações de oxidação e redução de um elétron. O quarto carreador de elétrons na cadeia é a flavoproteína **ferredoxina:NADP⁺-oxidoreductase**, que transfere elétrons da ferredoxina reduzida (Fd_{red}) ao NADP⁺:



Esta enzima é homóloga à ferredoxina:NAD-redutase das bactérias verdes sulfurosas (Figura 20-14b).

O complexo de citocromos *b₆f* liga os fotossistemas II e I

Os elétrons temporariamente estocados no plastoquinol como resultado da excitação do P680 no PSII são carreados para o P700 do PSI através do complexo de citocromos *b₆f* e da proteína solúvel plastocianina (Figura 20-16, centro). Da mesma forma que o complexo III das mitocôndrias, o complexo de citocromos *b₆f* (**Figura 20-21**) contém um citocromo tipo *b* com dois grupos heme (denominados *b_H* e

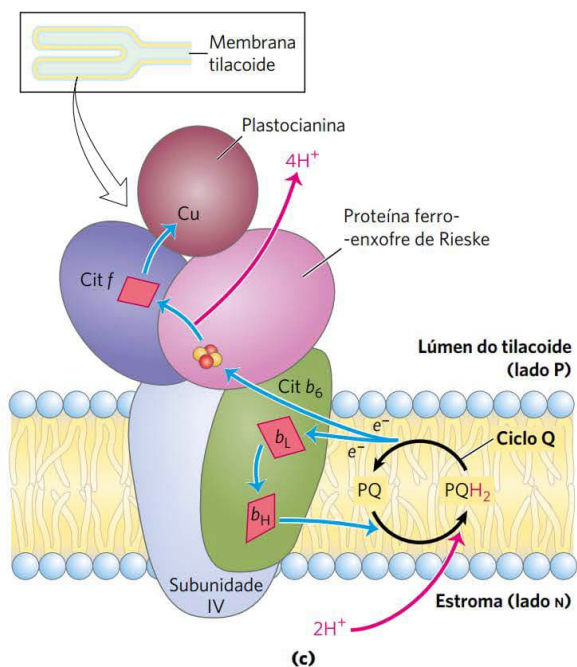
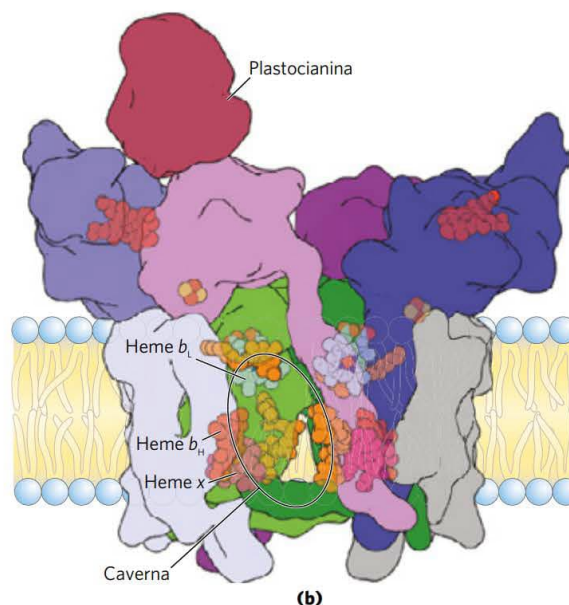


FIGURA 20-21 Fluxo de elétrons e prótons pelo complexo de citocromos *b₆f*. (a) A estrutura cristalina do complexo revela as posições dos transportadores de elétrons. Além dos hemes do citocromo *b* (heme *b_H* e *b_L*; também chamados de heme *b_N* e *b_P*, respectivamente, devido às suas proximidades aos lados N e P da bicamada) e do citocromo *f* (heme *f*), existe um quarto heme (heme *x*) próximo do heme *b_H*; há também um β -caroteno de função desconhecida. Dois sítios ligam plastoquinona: o sítio PQH₂ próximo ao lado P da bicamada, e o sítio PQ, próximo ao lado N. O centro de Fe-S da proteína de Rieske fica imediatamente fora da bicamada no lado P, e o sítio heme *f* está em um domínio proteico que se estende para o lúmen do tilacoide. A rota dos elétrons é mostrada para um dos monômeros, mas os dois conjuntos de carreadores no dímero carregam elétrons para a plastocianina.

(b) O complexo de citocromos *b₆f* é um homodímero arranjado para criar uma caverna que conecta os sítios PQH₂ e PQ. (Comparar com a estrutura do complexo III da mitocôndria, citocromo *bc₁*, na Figura 19-10.) Esta caverna permite à plastoquinona se mover entre os sítios de sua oxidação e redução.

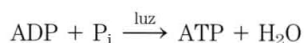
(c) O plastoquinol (PQH₂) formado no PSII é oxidado pelo complexo de citocromos *b₆f* em uma série de etapas como aquelas do ciclo Q no complexo III das mitocôndrias (ver Figura 19-11). Um elétron de PQH₂ passa para o centro de Fe-S da proteína de Rieske, o outro, para o heme *b_L* do citocromo *b₆*. O efeito líquido é a passagem de elétrons de PQH₂ para a proteína solúvel plastocianina, que os carrega para o PSI. [Fontes: (a, b) PDB ID 1VF5, G. Kurisu et al., *Science* 302:1009, 2003; PDB ID 2Q5B, Y. S. Bukhman-DeRuyter et al.]

b_L), uma proteína ferro-enzofre de Rieske (M_r 20.000) e o citocromo f (designado a partir de *frons*, em latim, “folha”). Os elétrons fluem pelo complexo de citocromos b_6f a partir de PQ_BH_2 para o citocromo f , a seguir para a plastocianina e, finalmente, para o $P700^+$, reduzindo-o.

Da mesma forma que o complexo III das mitocôndrias, o citocromo b_6f conduz elétrons de uma quinona reduzida – um carreador móvel de dois elétrons, lipossolúvel (Q em mitocôndrias, PQ_B em cloroplastos) – para uma proteína hidrossolúvel que carrega um elétron (citocromo c em mitocôndrias, plastocianina em cloroplastos). Como em mitocôndrias, a função desse complexo envolve um ciclo Q (ver Figura 19-11), no qual os elétrons passam, um de cada vez, de PQ_BH_2 para o citocromo b_6 . Esse ciclo resulta no bombeamento de prótons através da membrana, a partir do compartimento do estroma para o lúmen tilacoide. Até quatro prótons entram no lúmen para cada par de elétrons que passa através do complexo de citocromos b_6f . O resultado é a produção de um gradiente de prótons entre os dois lados da membrana tilacoide à medida que os elétrons passam do PSII para o PSI. Como o volume do lúmen achatado do tilacoide é pequeno, o influxo de um pequeno número de prótons tem um efeito relativamente grande no pH do lúmen. A diferença medida no pH entre o estroma (pH 8) e o lúmen do tilacoide (pH 5) representa uma diferença de 1.000 vezes na concentração de prótons – uma poderosa força propulsora para a síntese de ATP.

O fluxo cíclico de elétrons entre o PSI e o complexo de citocromos b_6f aumenta a produção de ATP em relação a NADPH

A via linear de elétrons da água ao $NADP^+$ produz um gradiente de prótons, utilizado para promover a síntese de ATP, e NADPH, utilizado em processos biossintéticos redutores. Esse movimento linear de elétrons é denominado **fluxo acíclico de elétrons**, para distingui-lo da alternativa, o **fluxo cíclico de elétrons**. O fluxo cíclico de elétrons envolve apenas o PSI, não o PSII (Figura 20-16). Os elétrons que passam do $P700$ para a ferredoxina não continuam até o $NADP^+$, retornando pelo complexo de citocromos b_6f até a plastocianina (esta via de elétrons encontra um paralelo com aquela das bactérias verdes sulfurosas, mostrada na Figura 20-14b). A plastocianina, então, doa elétrons ao $P700$, que os transfere à ferredoxina. Dessa forma, os elétrons são reciclados repetidas vezes pelo complexo de citocromos b_6f e pelo centro de reação do PSI, cada elétron impulsionado ao redor do ciclo pela energia de um fóton. O fluxo cíclico de elétrons não é acompanhado pela formação líquida de NADPH ou pela liberação de O_2 . No entanto, ele é acompanhado pelo bombeamento de prótons pelo complexo de citocromos b_6f e pela fosforilação de ADP a ATP, referida como **fotofosforilação cíclica**. A equação global para o fluxo cíclico de elétrons e a fotofosforilação é simplesmente



A partir da regulação da partição de elétrons entre a redução do $NADP^+$ e a fotofosforilação cíclica, uma planta

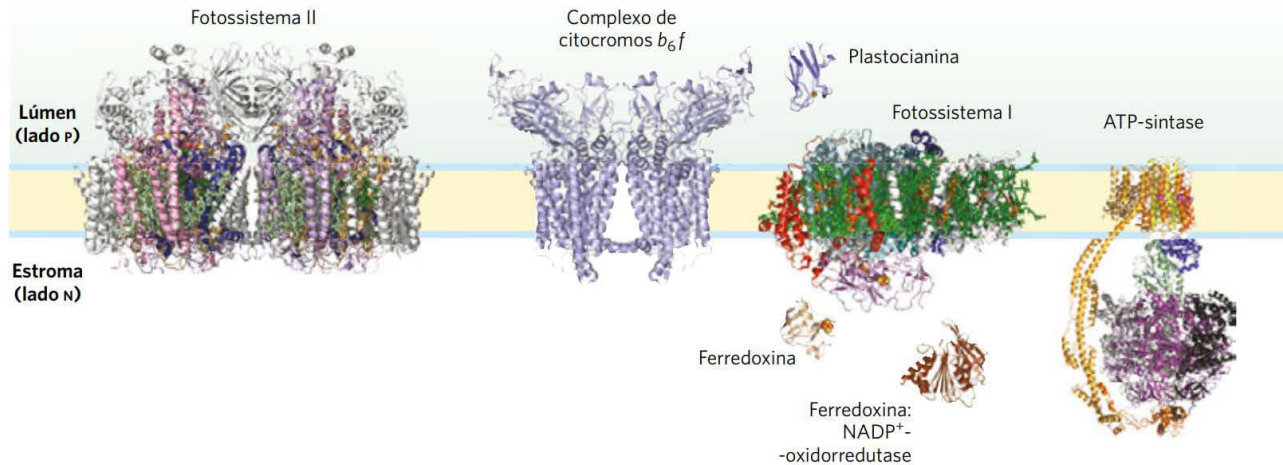
ajusta a razão de ATP para NADPH produzido nas reações fotodependentes para adequar as quantidades destes produtos às suas necessidades nas reações de assimilação de carbono e em outros processos biossintéticos. Como será visto na Seção 20.5, as reações de assimilação de carbono requerem ATP e NADPH em uma razão 3:2. Essa regulação das vias de transferência de elétrons é parte de uma adaptação de curto prazo a mudanças na cor (comprimento de onda) e na quantidade (intensidade) de luz, conforme descrito a seguir.

Transições de estado mudam a distribuição do LHCII entre os dois fotossistemas

No decurso de um dia ou de uma estação, as plantas são expostas à luz de intensidade e comprimento de onda altamente variável e, embora possam, de certo modo, alterar seu padrão de crescimento, elas não podem arrancar suas raízes e se mover de modo a otimizar a exposição à luz. Em vez disso, mecanismos celulares evoluíram para permitir às plantas uma adaptação a condições variáveis de luz. A energia necessária para excitar PSI ($P700$) é menor (luz de comprimento de onda mais longo, menor energia) que a energia necessária para excitar PSII ($P680$). Se o PSI e o PSII fossem fisicamente contíguos, os éxcitons que se originassem no sistema de antena do PSII migrariam para o centro de reação do PSI, deixando o PSII cronicamente subexcitado e interferindo com a operação do sistema de dois centros. Esse desequilíbrio no suprimento de éxcitons é impedido pela separação dos dois fotossistemas na membrana tilacoide (**Figura 20-22**). O PSII está localizado quase exclusivamente nas pilhas de membranas firmemente aderidas dos tilacoides dos grana; seu complexo coletor de luz associado (LHCII) controla a forte associação das membranas adjacentes dos grana. O PSI e o complexo ATP-sintase estão localizados quase exclusivamente nas membranas tilacoides não aderidas (as lamelas estromais), onde eles têm acesso aos conteúdos do estroma, incluindo ADP e $NADP^+$. O complexo de citocromos b_6f está presente primariamente nos grana.

A associação do LHCII com o PSI e o PSII depende da intensidade e do comprimento de onda da luz, os quais podem mudar no curto prazo, levando a **transições de estado** no cloroplasto. No estado 1, LHCII, PSII e PSI estão estruturados de modo a maximizar a captura de energia luminosa. Um resíduo crucial de Thr no LHCII não está fosforilado, e o LHCII se associa ao PSII. Sob condições de luz intensa ou azul, que favorecem a absorção pelo PSII, esse fotossistema reduz a plastoquinona a plastoquinol (PQH_2) mais rápido do que o PSI consegue oxidá-lo. O acúmulo resultante de PQH_2 ativa uma proteína-cinase, que desencadeia a transição para o estado 2 pela fosforilação de um resíduo de Thr no LHCII (**Figura 20-23**). A fosforilação enfraquece a interação de LHCII com a membrana antes firmemente aderida e com PSII; algum LHCII se dissocia e se move para os tilacoides do estroma. Ali, ele captura fótons (éxcitons) para PSI, acelerando a oxidação de PQH_2 e revertendo o desequilíbrio entre o fluxo de elétrons em PSI e PSII. Em luz menos intensa (na sombra ou com mais luz vermelha), o PSI oxida o PQH_2 mais rápido do que o PSII consegue fazê-lo, e o aumento

(a)



(b)

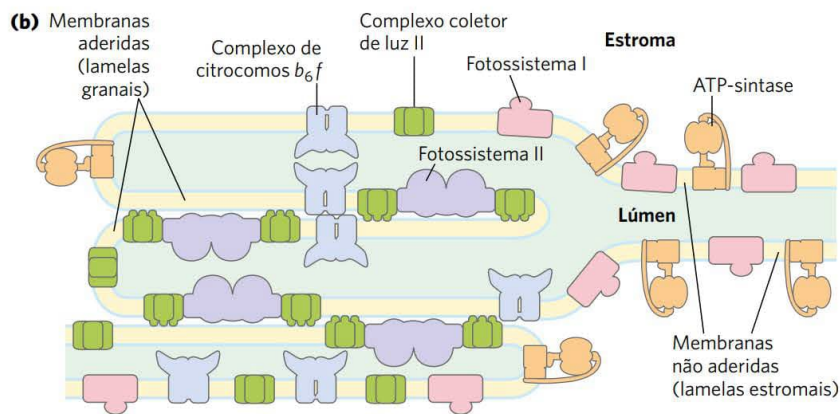


FIGURA 20-22 Localização de PSI e PSII nas membranas tilacoide. (a) Estruturas dos complexos e das proteínas solúveis do aparato fotossintético de uma planta vascular ou alga, desenhadas na mesma escala. A ATP-sintase bovina é mostrada. (b) O complexo coletor de luz LHCII e a ATP-sintase estão localizados tanto nas regiões de adesão da membrana tilacoide (lamelas granais, onde várias membranas estão em contato), quanto em regiões sem adesão (lamelas estromais), e têm pleno acesso a ADP e NADP^+ no estroma. O PSII está presente quase exclusivamente nas regiões de adesão nos grana, e o PSI quase exclusivamente nas regiões sem adesão, exposto ao estroma. O LHCII é o “adesivo” que mantém unidas as membranas tilacoide (ver Figura 20-23). [Fontes: (a) PSII: PDB ID 3WU2, Y. Umena et al., *Nature* 473:55, 2011; complexo de citocromos b_6f : PDB ID 2E74, E. Yamashita et al., *J. Mol. Biol.* 370:39, 2007; plastocianina: PDB ID 1AG6, Y. Xue et al., *Protein Sci.* 7:2099, 1998; PSI: PDB ID 4RKU, Y. Mazor et al.; ferredoxina: PDB ID 1A70, C. Binda et al., *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 54:1353, 1998; ferredoxina:NADP-reductase: PDB ID 1QG0, Z. Deng et al., *Nature Struct. Biol.* 6:847, 1999; ATP-sintase: PDB ID 5ARA, A. Zhou et al., *eLife* 4:e10180, 2015.)

resultante da [PQ] desencadeia a desfosforilação do LHCII, revertendo o efeito da fosforilação. A transição de estado na localização do LHCII é regulada de modo coordenado com a

transição da fotofosforilação cíclica para a acíclica: a via de elétrons é principalmente acíclica no estado 1 e principalmente cíclica no estado 2.

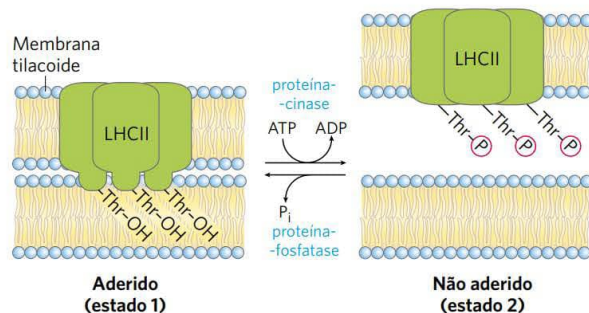


FIGURA 20-23 Equilibrando o fluxo de elétrons no PSI e no PSII por transição de estados. Nos tilacoide dos grana, um domínio hidrofóbico do LHCII em uma membrana insere-se na lamela vizinha e adere intimamente às duas membranas (estado 1). O acúmulo de plastoquinol (não mostrado) estimula uma proteína-cinase, que fosforila um resíduo de Thr no domínio hidrofóbico do LHCII, reduzindo sua afinidade pela membrana tilacoide vizinha e convertendo regiões de adesão dos tilacoide de grana em regiões de não adesão de tilacoide estromais (estado 2). Uma proteína-fosfatase específica reverte esta fosforilação regulatória quando a razão $[\text{PQ}]/[\text{PQH}_2]$ aumenta.

Quando a luz é tão intensa que as atividades combinadas de PSII e PSI não podem sintetizar ATP e NADPH suficientemente rápido para se ajustar ao suprimento de fótons, os carotenoides em LHCII absorvem o exciton e re-vertem o estado de excitação da clorofila antes que possa haver a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) capazes de causar dano. O gatilho para a mudança de um estado eficiente de coleta de luz para um estado de dissipação de energia é a diminuição no pH no espaço luminal, mas o mecanismo detalhado para essa transição ainda não é conhecido.

A água é quebrada pelo complexo de liberação de oxigênio

A fonte final de elétrons passados para o NADPH na fotossíntese de plantas (oxigênica) é a água. Tendo doado um elétron para a feofitina, o $P680^+$ (do PSII) precisa adquirir um elétron para retornar a seu estado basal, em preparação para a captura de outro fóton. A princípio, o elétron necessário pode vir de vários compostos orgânicos e inorgânicos. As bactérias fotossintéticas usam uma variedade de doadores de elétrons com esse objetivo – acetato, succinato, malato ou sulfeto – dependendo do que está disponível em um determinado nicho ecológico. Cerca de 3 bilhões de anos atrás, a evolução das bactérias fotossintéticas primitivas (as progenitoras das cianobactérias modernas) produziu um fotossistema capaz de retirar elétrons de um doador que sempre está disponível: a água. Duas moléculas de água são quebradas, produzindo quatro elétrons, quatro prótons e oxigênio molecular:



Um único fóton de luz visível não tem energia suficiente para quebrar as ligações na água; quatro fótons são necessários nessa reação de clivagem fotolítica.

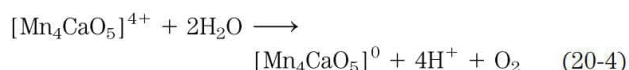
Os quatro elétrons removidos da água não passam diretamente ao $P680^+$, que só pode aceitar um elétron de cada vez. Em vez disso, um esquema molecular notável, o **complexo de liberação de oxigênio** (também chamado de **complexo de quebra da água**) passa quatro elétrons, *um de cada vez*, para o $P680^+$ (**Figura 20-24a**). O doador imediato de elétrons para o $P680^+$ é um resíduo de Tyr (comumente designado como Z ou Tyr_Z) na subunidade D1 do centro de reação do PSII. O resíduo de Tyr perde tanto um próton quanto um elétron, gerando o radical livre eletricamente neutro de Tyr, $^{\bullet}\text{Tyr}$:



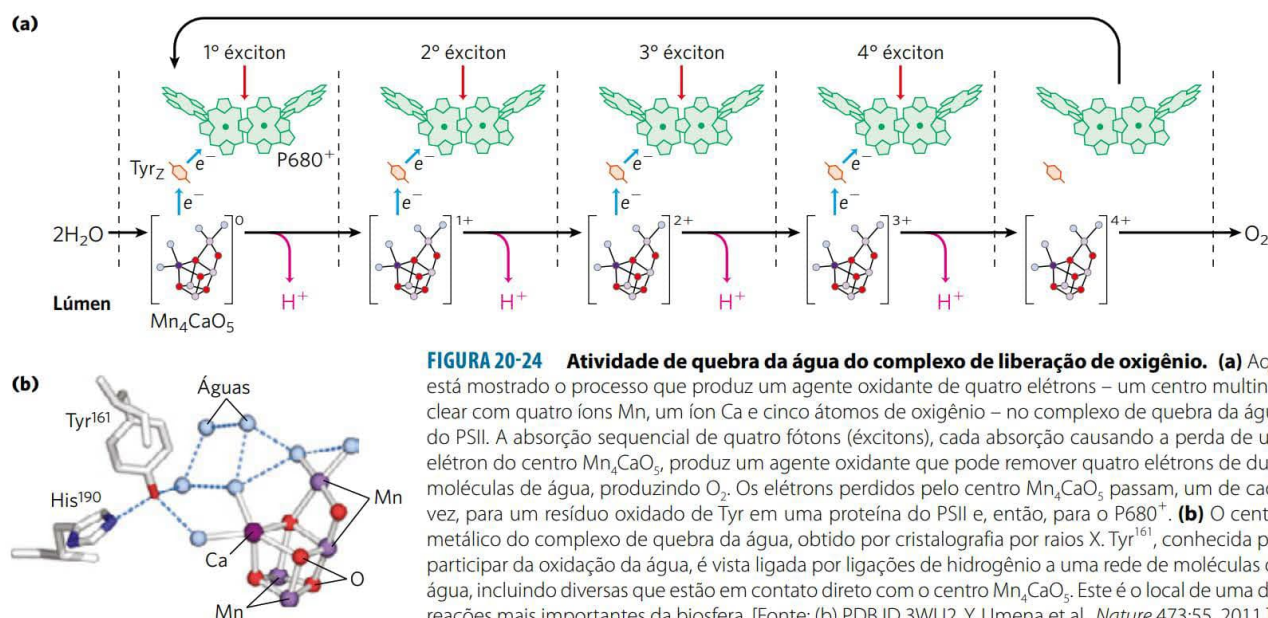
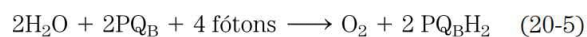
O radical Tyr retoma o elétron e o próton perdidos, oxidando um agrupamento de quatro íons manganês e um íon cálcio no complexo de quebra da água. A cada transferência individual de elétrons, o centro Mn_4CaO_5 torna-se mais oxidado. Quatro transferências individuais de elétrons, cada uma correspondendo à absorção de um fóton, produzem uma carga de $4+$ no centro Mn_4CaO_5 (Figura 20-24):



Neste estado, o centro Mn_4CaO_5 pode retirar quatro elétrons de um par de moléculas de água, liberando $4H^+$ e O_2 :



Como os quatro prótons produzidos nesta reação são liberados no lúmen do tilacoide, o complexo de liberação de oxigênio atua como bomba de prótons, usando a energia da transferência de elétrons. A soma das equações 20-1 (p. 768) a 20-4 é



A estrutura detalhada do centro de liberação de oxigênio foi obtida por cristalografia por raios X de alta resolução. O agrupamento metálico assume a forma de uma cadeira (Figura 20-24b). O assento e as pernas da cadeira são feitos por três íons Mn, um íon Ca e quatro átomos de O; o quarto Mn e outro O formam o encosto da cadeira. Quatro moléculas de água também são vistas na estrutura cristalina, duas associadas com um dos íons Mn, as outras duas com o íon Ca. É possível que uma ou mais dessas moléculas de água seja aquela que sofre oxidação para produzir O_2 . Esse centro metálico está associado a diversas proteínas periféricas de membrana no lado luminal da membrana tilacoide, que, presumivelmente, estabilizam o agrupamento. O resíduo de Tyr designado Z, por meio do qual os elétrons se movem entre a água e o centro de reação do PSII, está conectado a uma rede de moléculas de água ligadas por ligações de hidrogênio, que inclui as quatro associadas com o centro Mn_4CaO_5 . O mecanismo detalhado da oxidação de água pelo centro Mn_4CaO_5 não é conhecido, mas está sob intensa investigação. A reação é central à vida na Terra e pode envolver química bioinorgânica singular. A determinação da estrutura do centro polimetálico tem inspirado diversas hipóteses razoáveis e testáveis. Fique ligado.

RESUMO 20.2 Centros de reação fotoquímica

- As bactérias têm um único centro de reação fotoquímica; nas bactérias púrpuras, ele é do tipo feofitina-quinona, e em bactérias verdes sulfurosas, do tipo Fe-S.
- Estudos estruturais do centro de reação de uma bactéria púrpura forneceram informações sobre o fluxo de elétrons promovido pela luz, de um par excitado especial de moléculas de clorofila (P870), através da feofitina, para quinonas. Os elétrons, então, passam das quinonas, pelo complexo de citocromos bc_1 , e de volta ao par especial de clorofilas.
- Uma via alternativa, em bactérias verdes sulfurosas, envia elétrons de quinonas reduzidas para o NAD^+ .
- Em cianobactérias e plantas, há dois centros de reação diferentes, PSI e PSII, arranjados em sequência.
- No centro de reação do fotossistema II das plantas, um par especial de clorofilas (P680) passa elétrons para a plastoquinona, e os elétrons perdidos pelo P680 são repostos por elétrons da H_2O (doadores de elétrons diferentes da H_2O são usados em outros organismos).
- O fotossistema I das plantas passa elétrons de um par especial excitado (P700) em seu centro de reação, via uma série de carreadores, para a ferredoxina, que, então, reduz $NADP^+$ a NADPH.
- O fluxo de elétrons pelo complexo de citocromos b_6f bombeia prótons através da membrana plasmática, criando uma força próton-motriz que fornece a energia para a síntese de ATP por uma ATP-sintase. A atividade de quebra da água também move prótons do estroma para o lúmen tilacoide, contribuindo para o gradiente de prótons.

- O fluxo linear de elétrons pelos fotossistemas produz NADPH e ATP. O fluxo cíclico de elétrons produz apenas ATP e permite variabilidade nas proporções de NADPH e ATP formados.
- A localização do LHCII entre as lamelas granais e estromais pode mudar e é indiretamente controlada pela intensidade da luz, otimizando a distribuição de éxcitons entre PSI e PSII para uma captura eficiente de energia.
- A quebra da água promovida pela luz é catalisada por um complexo proteico contendo Mn_4CaO_5 ; é produzido O_2 . A plastoquinona reduzida carrega elétrons para o complexo de citocromos b_6f . Daqui eles passam para a plastocianina e então para o P700, para repor aqueles perdidos durante sua fotoexcitação.

20.3 Síntese de ATP pela fotofosforilação

A atividade combinada dos dois fotossistemas vegetais move elétrons da água ao $NADP^+$, conservando parte da energia da luz absorvida como NADPH (Figura 20-16). De modo simultâneo, os prótons são bombeados através da membrana tilacoide e energia é conservada na forma de um potencial eletroquímico. Consideraremos agora o processo pelo qual esse gradiente de prótons permite a síntese de ATP, o outro produto de conservação de energia das reações fotodependentes.



Daniel Arnon, 1910-1994
[Fonte: Reinhard Bachofen.]

Em 1954, Daniel Arnon e colaboradores descobriram que o ATP é gerado a partir de ADP e P_i durante a transferência fotossintética de elétrons em cloroplastos de espinafre iluminados. Apoio para essas descobertas veio do trabalho de Albert Frenkel, que detectou produção de ATP fotodependente em estruturas membranáceas contendo pigmentos, chamadas de **cromatóforos**, derivadas de bactérias fotossintéticas. Os

pesquisadores concluíram que parte da energia luminosa capturada pelos sistemas fotossintéticos desses organismos é transformada em energia de ligação do fosfato no ATP, no processo de fotofosforilação.

Um gradiente de prótons acopla o fluxo de elétrons e a fosforilação

Diversas propriedades da transferência fotossintética de elétrons e da fotofosforilação em cloroplastos indicam que um gradiente de prótons desempenha o mesmo papel que na fosforilação oxidativa mitocondrial. (1) Os centros de reação, os carreadores de elétrons e as enzimas formadoras de ATP estão localizados em uma membrana impermeável a prótons – a membrana tilacoide – que precisa estar intacta para sustentar a fotofosforilação. (2) A fotofosforilação pode ser desacoplada do fluxo de elétrons por reagentes



André Jagendorf
[Fonte: cortesia do Professor
André Jagendorf.]

que promovem a passagem de prótons através da membrana tilacoide. (3) A fotofosforilação pode ser bloqueada por venturicidina e agentes semelhantes, que inibem a formação de ATP a partir de ADP e P_i pela ATP-sintase mitocondrial. (4) A síntese de ATP é catalisada por complexos CF_0CF_1 , localizados na superfície externa das membranas tilacoides e muito semelhantes em estrutura e função aos complexos F_0F_1 das mitocôndrias.

Moléculas transferidoras de elétrons na cadeia de carreadores que conecta o PSII e o PSI são assimetricamente orientadas na membrana tilacoide, de forma que o fluxo fotoinduzido de elétrons resulta no movimento líquido de prótons através da membrana, do lado estromal para o lúmen do tilacoide (Figura 20-25). Em 1966, André Jagendorf mostrou que um gradiente de pH através da membrana tilacoide (alcalina do lado de fora) poderia fornecer a força propulsora para gerar ATP. Essas observações iniciais de Jagendorf proporcionaram algumas das evidências experimentais mais importantes a favor da hipótese quimiosmótica de Mitchell.

Jagendorf incubou cloroplastos no escuro em tampão de pH 4; o tampão penetrou lentamente no compartimento interno dos tilacoides, diminuindo seu pH interno. Ele adicionou ADP e P_i na suspensão de cloroplastos no escuro e, então, de repente, aumentou o pH do meio externo

para 8, criando momentaneamente um grande gradiente de pH através da membrana. À medida que os prótons saíam dos tilacoides em direção ao meio, ATP era gerado a partir de ADP e P_i . Como a formação de ATP ocorria no escuro (sem acréscimo de energia pela luz), esse experimento mostrou que um gradiente de pH através da membrana é um estado de alta energia que, da mesma forma que na fosforilação oxidativa mitocondrial, pode mediar a transdução de energia da transferência de elétrons em energia química do ATP.

A estequiometria aproximada da fotofosforilação foi estabelecida

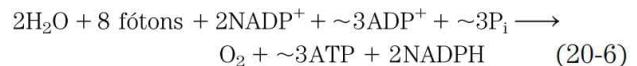
À medida que os elétrons se deslocam da água para o $NADP^+$ nos cloroplastos vegetais, cerca de 12 prótons movimentam-se do estroma para o lúmen do tilacoide para cada quatro elétrons que passam (i.e., por O_2 formado). Quatro desses prótons são transportados pelo complexo de liberação de oxigênio e até oito pelo complexo de citocromos b_6f . O resultado mensurável é uma diferença de 1.000 vezes na concentração de prótons através da membrana tilacoide ($\Delta pH = 3$). Lembre-se de que a energia estocada em um gradiente de prótons (o potencial eletroquímico) tem dois componentes: uma diferença na concentração de prótons (ΔpH) e um potencial elétrico ($\Delta \psi$) devido à separação de cargas. Em cloroplastos, o ΔpH é o componente dominante; o movimento de contra-íons aparentemente dissipa a maior parte do potencial elétrico. Em cloroplastos iluminados, a energia estocada no gradiente por mol de prótons é

$$\Delta G = 2,3RT \Delta pH + ZF \Delta \psi = -17 \text{ kJ/mol}$$

de forma que o movimento de 12 moles de prótons através da membrana tilacoide representa uma conservação de cerca de 200 kJ de energia – energia suficiente para promover a síntese de vários moles de ATP ($\Delta G^\circ = 30,5 \text{ kJ/mol}$). Medidas experimentais fornecem valores de cerca de 3 ATP por O_2 produzido.

Pelo menos oito fótons precisam ser absorvidos para impulsionar quatro elétrons da H_2O até o NADPH (um fóton por elétron em cada centro de reação). A energia em oito fótons de luz visível é mais do que suficiente para a síntese de três moléculas de ATP.

A síntese de ATP não é a única reação de conservação de energia da fotossíntese em plantas; o NADPH formado ao fim da transferência de elétrons também é energeticamente rico. A equação geral para a fotofosforilação acíclica (um termo explicado a seguir) é



A ATP-sintase dos cloroplastos é semelhante àquela das mitocôndrias

A enzima responsável pela síntese de ATP nos cloroplastos é um grande complexo com dois componentes funcionais,

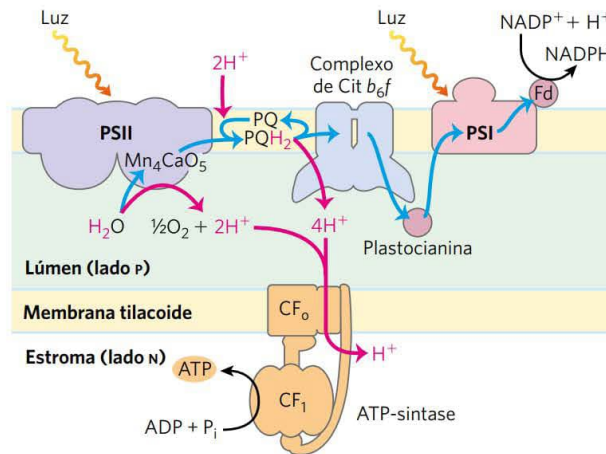


FIGURA 20-25 Circuitos de prótons e de elétrons durante a fotofosforilação. Os elétrons (setas azuis) movem-se da água, por meio do PSII, através de uma cadeia intermediária de carregadores e do PSI, chegando, por fim, ao $NADP^+$. Os prótons (setas vermelhas) são bombeados para o lúmen do tilacoide pelo fluxo de elétrons por meio de carreadores que ligam o PSII e o PSI, entrando novamente no estroma através de canais de prótons formados pelo CF_0 da ATP-sintase. A subunidade CF_1 catalisa a síntese de ATP.

CF_0 e CF_1 (C designando sua localização nos cloroplastos). CF_0 é um poro transmembrana de prótons, composto por várias proteínas integrais de membrana e homólogo ao F_0 mitocondrial. CF_1 é um complexo proteico periférico de membrana, muito similar na composição, na estrutura e na função das subunidades ao F_1 mitocondrial.

A microscopia eletrônica de seções de cloroplastos mostra os complexos de ATP-sintase como projeções arredondadas na superfície *externa* (estromal, ou N) das membranas tilacoide; esses complexos correspondem aos complexos de ATP-sintase vistos como projeções na superfície *interna* (matriz, ou N) da membrana mitocondrial interna. Assim, a relação entre a orientação da ATP-sintase e a direção do bombeamento de prótons é a mesma nos cloroplastos e nas mitocôndrias. Em ambos os casos, a porção F_1 da ATP-sintase está localizada no lado mais alcalino (N) da membrana, pela qual prótons fluem a favor do gradiente de concentração; a direção do fluxo de prótons em relação a F_1 é a mesma em ambos os casos: de P para N (Figura 20-26).

Acredita-se que o mecanismo da ATP-sintase dos cloroplastos também seja essencialmente idêntico àquele de sua análoga mitocondrial; ADP e P_i prontamente se condensam para formar ATP na superfície da enzima, e a liberação deste ATP ligado à enzima requer uma força próton-motriz. A catálise rotacional envolve sequencialmente cada uma das três subunidades β da ATP-sintase na síntese de ATP, na liberação de ATP e na ligação de $ADP + P_i$ (ver Figuras 19-26 e 19-27).

Prediz-se que a ATP-sintase do cloroplasto de espinafre, com 14 subunidades c em seu complexo CF_0 , tenha uma razão de ATP formado para elétrons transferidos menor, comparada com os complexos F_0 de bovinos, leveduras

e *E. coli*, com 8, 10 e 10 subunidades c , respectivamente (ver Figura 19-29).

RESUMO 20.3 Síntese de ATP pela fotofosforilação

- Em plantas, tanto a reação de quebra da água quanto o fluxo de elétrons pelo complexo de citocromos b_6f são acompanhados pelo bombeamento de prótons através da membrana tilacoide. A força próton-motriz assim criada promove a síntese de ATP por um complexo CF_0 . CF_1 similar ao complexo F_0F_1 mitocondrial.
- O mecanismo catalítico do CF_0CF_1 é muito semelhante ao da ATP-sintase de mitocôndrias e bactérias. A rotação física promovida pelo gradiente de prótons é acompanhada pela síntese de ATP em sítios que se alternam entre três conformações, uma com alta afinidade por ATP, uma com alta afinidade por ADP e P_i e uma com baixa afinidade pelos dois nucleotídeos.

20.4 Evolução da fotossíntese oxigênica

O aparecimento da fotossíntese oxigênica na Terra há cerca de 2,5 bilhões de anos foi um evento crucial na evolução da biosfera. Antes disso, a atmosfera terrestre era formada por metano, CO_2 e N_2 . A Terra estava essencialmente desprovida de oxigênio molecular e carecia da camada de ozônio, que protege os organismos vivos da radiação UV solar. A fotossíntese oxigênica tornou disponível um suprimento quase ilimitado de agente redutor (H_2O) para promover a produção de compostos orgânicos por reações biossintéticas redutoras. Evoluíram mecanismos que permitiam aos organismos usar O_2 comoceptor final de elétrons em transferências de elétrons altamente energéticas a partir de substratos orgânicos, empregando a energia da oxidação para sustentar seu metabolismo. O complexo aparato fotossintético de uma planta vascular moderna é o ápice de uma série de eventos evolutivos, o mais recente sendo a aquisição, por células eucarióticas, de um endossimbionte cianobacteriano.

Os cloroplastos evoluíram a partir de antigas bactérias fotossintéticas

Os cloroplastos de organismos modernos lembram as mitocôndrias em diversas propriedades e acredita-se que tenham se originado pelo mesmo mecanismo que deu origem às mitocôndrias: endossimbiose. Da mesma forma que as mitocôndrias, os cloroplastos contêm seu próprio DNA e sua própria maquinaria de síntese proteica. Alguns dos polipeptídeos das proteínas dos cloroplastos são codificados por genes dos cloroplastos e sintetizados nos cloroplastos; outros são codificados por genes nucleares, sintetizados fora dos cloroplastos e importados (Capítulo 27). Quando as células vegetais crescem e se dividem, os cloroplastos dão origem a novos cloroplastos por divisão, durante a qual seu DNA é replicado e dividido entre os cloroplastos-filhos. A maquinaria e o mecanismo de captura de luz, fluxo de elétrons e síntese de ATP em cianobactérias modernas são semelhantes em muitos as-

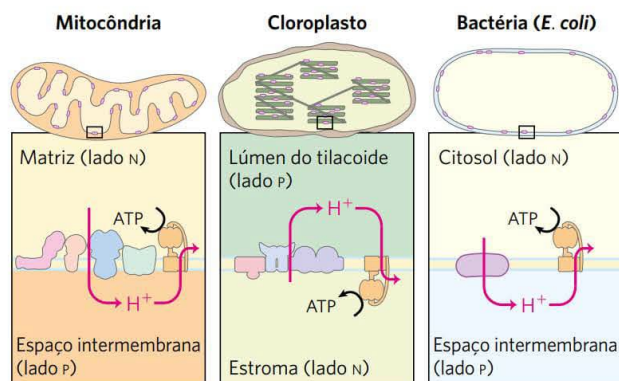
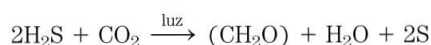


FIGURA 20-26 A orientação da ATP-sintase é fixa em relação ao gradiente de prótons. De modo superficial, o sentido do bombeamento de prótons nos cloroplastos pode parecer oposto àquele observado nas mitocôndrias e nas bactérias. Nas mitocôndrias e nas bactérias, os prótons são bombeados *para fora* da organela ou célula, e F_1 está no lado *interno* da membrana; nos cloroplastos, os prótons são bombeados *para dentro* do lúmen tilacoide, e CF_1 está no lado *externo* da membrana tilacoide. Contudo, exatamente o mesmo mecanismo de conversão de energia (do gradiente de prótons ao ATP) é utilizado em todos os três casos. O ATP é sintetizado na matriz da mitocôndria, no estroma dos cloroplastos e no citossol das bactérias.

pectos àqueles dos cloroplastos vegetais. Essas observações levaram à hipótese hoje amplamente aceita de que os progenitores evolutivos das células vegetais modernas são eucariotos primitivos que englobaram cianobactérias fotossintéticas e estabeleceram relações endossimbióticas estáveis com elas (ver Figura 1-40).

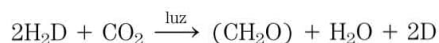
Pelo menos metade da atividade fotossintética na Terra hoje ocorre em microrganismos – algas, outros eucariotos fotossintéticos e bactérias fotossintéticas. As cianobactérias têm PSII e PSI em sequência, e o PSII tem uma atividade de quebra de água associada que lembra aquela das plantas. No entanto, os outros grupos de bactérias fotossintéticas têm apenas um centro de reação e não quebram água ou produzem O_2 . Muitos são anaeróbios obrigatórios e não toleram O_2 ; eles precisam usar um outro composto que não seja a água como doador de elétrons. Algumas bactérias fotossintéticas usam compostos inorgânicos como doadores de elétrons (e de hidrogênio). Por exemplo, as bactérias verdes sulfurosas usam sulfeto de hidrogênio:



Estas bactérias, em vez de produzirem O_2 molecular, formam enxofre elementar como produto da oxidação do H_2S . (Elas posteriormente oxidam o S a SO_4^{2-} .) Outras bactérias fotossintéticas usam compostos orgânicos, como o lactato, como doadores de elétrons:



A semelhança fundamental entre a fotossíntese das plantas e das bactérias, apesar das diferenças nos doadores de elétrons que elas utilizam, torna-se mais óbvia quando a equação da fotossíntese é escrita na sua forma mais geral



na qual H_2D é um doador de elétrons (e de hidrogênio) e D é sua forma oxidada. H_2D pode ser água, sulfeto de hidrogênio, lactato ou algum outro composto orgânico, dependendo da espécie. É muito provável que as bactérias inicialmente tenham desenvolvido a capacidade fotossintética usando H_2S como fonte de elétrons.

Os ancestrais das cianobactérias modernas provavelmente surgiram da combinação do material genético de dois tipos de bactérias fotossintéticas, uma com sistemas do tipo observado em bactérias púrpuras modernas (com via de elétrons do tipo PSII) e uma com sistemas do tipo visto em bactérias verdes sulfurosas (com via de elétrons que lembra aquela do PSI). A bactéria com dois fotossistemas independentes pode ter usado um deles em um determinado conjunto de condições e outro em condições diferentes. Ao longo do tempo, um mecanismo para conectar os dois fotossistemas para uso simultâneo evoluiu, e o sistema tipo PSII adquiriu a capacidade, encontrada em cianobactérias modernas, de quebrar a água.

As cianobactérias modernas podem sintetizar ATP por fosforilação oxidativa ou por fotofosforilação, em-

bora não tenham nem mitocôndrias, nem cloroplastos. A maquinaria enzimática para ambos os processos está em uma membrana plasmática altamente convoluta (Figura 20-27). Três componentes proteicos funcionam nos dois processos, fornecendo evidências de que tenham uma origem evolutiva comum (Figura 20-28). Primeiro, o complexo capaz de bombear prótons, constituído pelos citocromos b_6f , carrega elétrons da plastoquinona para o citocromo c_6 na fotossíntese e depois carrega elétrons da ubiquinona para o citocromo c_6 na fosforilação oxidativa – o papel desempenhado pelos citocromos bc_1 nas mitocôndrias. Segundo, o citocromo c_6 , homólogo ao citocromo c mitocondrial, carrega elétrons do complexo III para o complexo IV em cianobactérias; ele também pode carregar elétrons do complexo de citocromos b_6f para o PSI – papel desempenhado em plantas pela plastocianina. Vê-se, portanto, a homologia funcional entre o complexo de citocromos b_6f cianobacteriano e o complexo de citocromos bc_1 mitocondrial, e entre o citocromo c_6 cianobacteriano e a plastocianina vegetal. O terceiro componente conservado é a ATP-sintase, que funciona na fosforilação oxidativa e na fotofosforilação em cianobactérias e nas

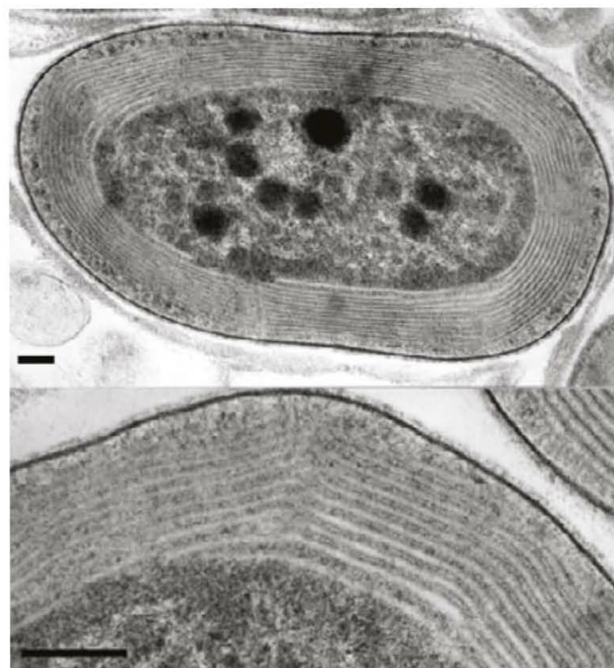


FIGURA 20-27 As membranas fotossintéticas de uma cianobactéria. Nestes cortes finos de uma cianobactéria, vistos por microscopia eletrônica de transmissão, as múltiplas camadas das membranas internas são vistas preenchendo metade do volume total da célula. O amplo sistema de membranas cumpre a mesma função dos tilacoides das plantas vasculares, proporcionando uma grande área superficial, que contém toda a maquinaria fotossintética. (Barra = 100 nm.) [Fonte: S. R. Miller et al. Discovery of a free-living chlorophyll *d*-producing cyanobacterium with a hybrid proteobacterial/cyanobacterial small-subunit rRNA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:850, 2005, Fig. 2. © 2005 National Academy of Sciences.]

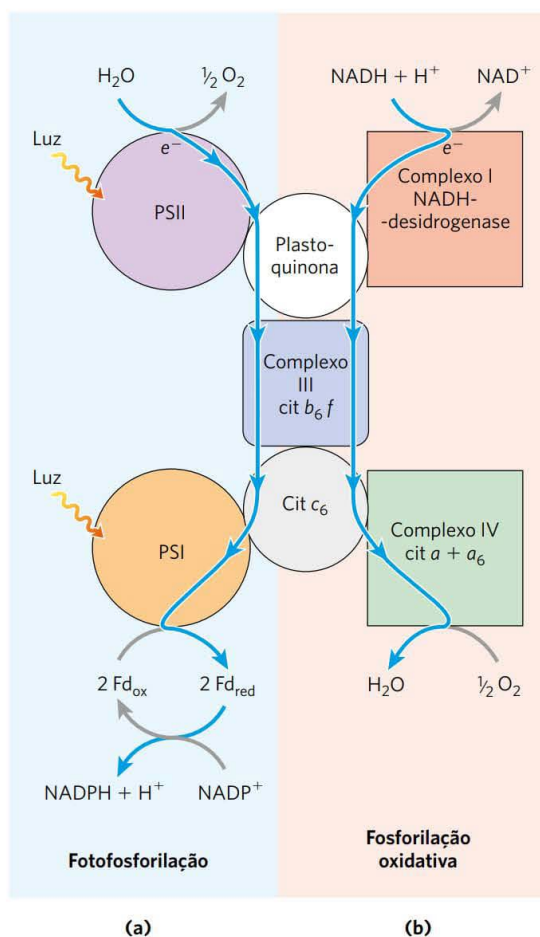


FIGURA 20-28 Os papéis duplos dos citocromos b_6f e do citocromo c_6 em cianobactérias refletem origens evolutivas. As cianobactérias usam os citocromos b_6f , o citocromo c_6 e a plastoquinona tanto para a fosforilação oxidativa quanto para a fotofosforilação. **(a)** Na fotofosforilação, os elétrons fluem (setas azuis) da água para o NADP^+ . **(b)** Na fosforilação oxidativa, os elétrons fluem do NADH para o O_2 . Ambos os processos são acompanhados pelo movimento de prótons através da membrana, realizado por um ciclo Q.

mitocôndrias e nos cloroplastos de eucariotos fotossintéticos. A estrutura e o mecanismo notável dessa enzima foram fortemente conservados ao longo da evolução.

Em *Halobacterium*, uma só proteína absorve luz e bombeia prótons para promover a síntese de ATP

Em certas arqueobactérias modernas, evoluiu um mecanismo bastante diferente para converter a energia da luz em gradiente eletroquímico. As arqueobactérias halofílicas (“que gostam de sal”) *Halobacterium salinarum* (comumente referidas como *halobacterium*) vivem apenas em lagoas e lagos salgados (p. ex., o Grande Lago Salgado e o Mar Morto), onde há uma alta concentração salina que pode ex-

ceder 4 M – resultado da perda de água por evaporação. De fato, as halobactérias não podem viver em concentrações de NaCl menores que 3 M. Esses organismos são aeróbios e normalmente utilizam O_2 para oxidar moléculas orgânicas usadas como combustível. No entanto, a solubilidade do O_2 é tão baixa em lagoas salgadas que, algumas vezes, o metabolismo oxidativo precisa ser suplementado pela luz solar como fonte alternativa de energia.

A membrana plasmática de *H. salinarum* apresenta porções que contêm o pigmento de absorção de luz **bacteriorrodopsina**, o qual contém retinal (o derivado aldeído da vitamina A; ver Figura 10-20) como um grupo prostético capaz de absorver luz. Quando as células são iluminadas, o retinal-todo-*trans* ligado à bacteriorrodopsina absorve um fóton e sofre fotoisomerização para retinal-13-*cis*, forçando uma mudança conformacional na proteína. A restauração do retinal-todo-*trans* é acompanhada pelo movimento de saída de prótons através da membrana plasmática. A bacteriorrodopsina, com apenas 247 resíduos de aminoácidos, é a mais simples bomba de prótons impulsionada pela luz que se conhece. A diferença na estrutura tridimensional da bacteriorrodopsina no escuro e depois da iluminação (**Figura 20-29a**) sugere uma via pela qual uma série de saltos de prótons em concerto poderia efetivamente mover um próton através da membrana. O cromóforo retinal está ligado por uma ligação via base de Schiff ao grupo ϵ -amino de um resíduo de Lys. No escuro, o nitrogênio dessa base de Schiff está protonado; quando iluminado, a fotoisomerização do retinal baixa o pK_a desse grupo, e ele libera seu próton para um resíduo de Asp próximo, desencadeando uma série de saltos laterais de prótons que acabam resultando na liberação de um próton na superfície externa da membrana (**Figura 20-29b**).

O potencial eletroquímico através da membrana promove a volta dos prótons para dentro da célula por meio de um complexo de ATP-sintase de membrana muito similar àquele das mitocôndrias e dos cloroplastos. Assim, quando o O_2 é limitado, as halobactérias podem usar a luz para suplementar o ATP sintetizado pela fosforilação oxidativa. As halobactérias não liberam O_2 e nem realizam a fotoredução do NADP^+ ; sua maquinaria de fototransdução é, portanto, muito mais simples do que aquela de cianobactérias ou plantas. Ainda assim, seu mecanismo de bombeamento de prótons pode se revelar um protótipo para muitas outras bombas de íons mais complexas.

RESUMO 20.4 Evolução da fotossíntese oxigênica

- As cianobactérias modernas são derivadas de um organismo antigo que adquiriu dois fotossistemas, um do tipo encontrado hoje em bactérias púrpuras, e o outro do tipo encontrado em bactérias verdes sulfurosas.
- Muitos microrganismos fotossintéticos obtêm elétrons para a fotossíntese não da água, mas de doadores, como o H_2S .
- As cianobactérias, com os fotossistemas em sequência e com uma atividade de quebra de água que liberou oxigênio.

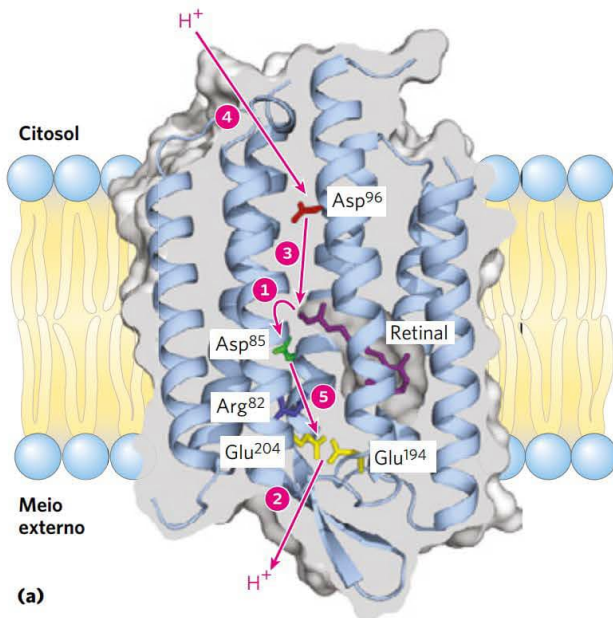
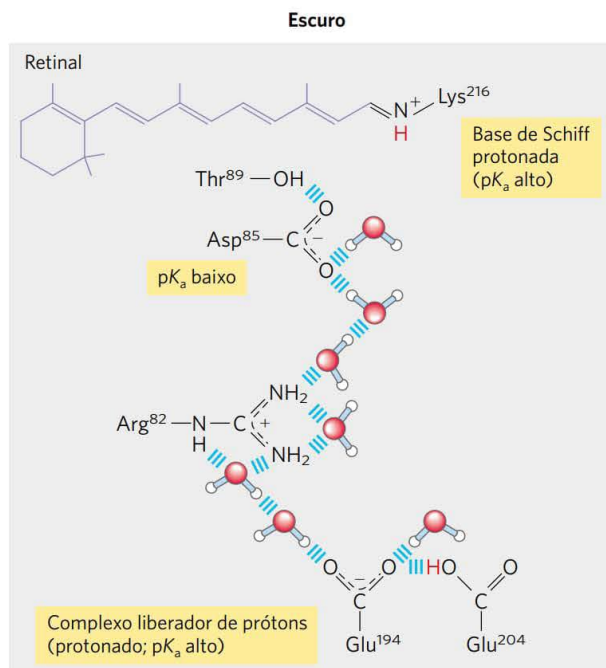
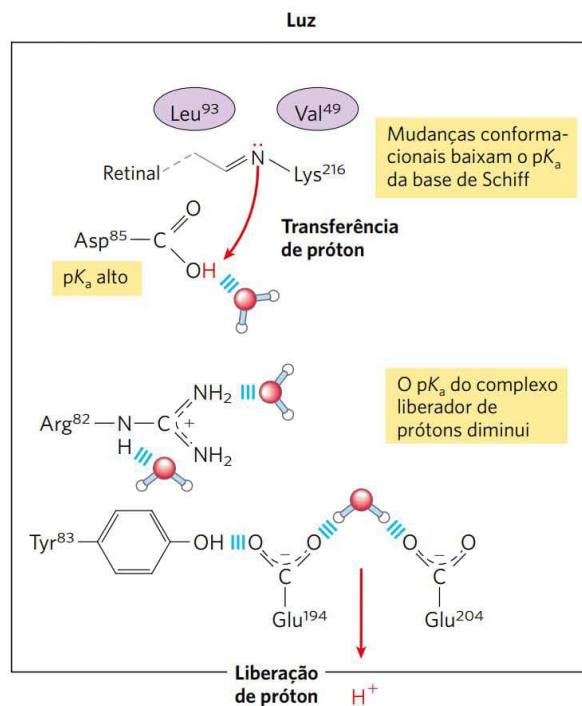


FIGURA 20-29 Um mecanismo diferente para o bombeamento de prótons evoluiu independentemente em uma arqueobactéria halofílica. (a) A bacteriorrodopsina (*M*, 26.000) de *Halobacterium halobium* tem sete α -hélices que atravessam a membrana. O cromóforo retinal-todo-*trans* (em púrpura) está ligado covalentemente por meio de uma base de Schiff ao grupo ϵ -amino de um resíduo de Lys bem no interior da membrana. Ao longo da proteína estão uma série de resíduos de Asp e Glu e uma série de moléculas de água proximamente associadas, que, juntas, fornecem a via transmembrana para prótons (setas vermelhas). As etapas de 1 a 5 indicam movimentos de prótons, descritos a seguir.

(b) No escuro (painel à esquerda), a base de Schiff está protonada. A iluminação (painel à direita) fotoisomeriza o retinal, forçando mudanças conformacionais sutis na proteína que alteram a distância entre a base de Schiff e seus resíduos de aminoácidos vizinhos. A interação com estes vizinhos (Leu⁹³ e Val⁴⁹) baixa o pK_a da base de Schiff protonada, e esta doa seu próton a um grupo carboxila próximo no Asp⁸⁵ [etapa 1 em (a)]. Isso inicia uma série de saltos laterais de prótons combinados entre moléculas de água (ver Figura 2-14) no interior da proteína, que termina com 2 a liberação de um próton que estava sendo compartilhado por Glu¹⁹⁴ e Glu²⁰⁴ perto da superfície extracelular. (Tyr⁸³ forma uma ligação de hidrogênio com Glu¹⁹⁴, que facilita esta liberação de prótons.) 3 A base de Schiff readquire um próton do Asp⁹⁶, o qual 4 retira um próton do citosol. 5 Por fim, o Asp⁸⁵ doa seu próton, levando a uma nova protonação do par Glu²⁰⁴-Glu¹⁹⁴. Este sistema está agora pronto para outra rodada de bombeamento de prótons. [Fontes: (a) PDB ID 1C8R, H. Luecke et al., *Science* 286:255, 1999. (b) Informação obtida de R. B. Gennis e T. G. Ebrey, *Science* 286:252, 1999.]



(b)



nio para a atmosfera, apareceram na Terra há cerca de 2,5 bilhões de anos.

- Os cloroplastos, assim como as mitocôndrias, evoluíram de bactérias vivendo endossimbioticamente em células eucarióticas primitivas. As ATP-sintases de bactérias, cianobactérias, mitocôndrias e cloroplastos comparti-

lham um precursor evolutivo comum e um mecanismo enzimático comum.

- Um mecanismo inteiramente diferente para converter a energia da luz em um gradiente de prótons evoluiu em arqueobactérias modernas, no qual o pigmento coletor de luz é o retinal.

20.5 Reações de fixação de carbono

Os organismos fotossintéticos utilizam o ATP e o NADPH produzidos nas reações fotodependentes da fotossíntese para sintetizar todos os milhares de componentes que constituem o organismo. Isso é possível devido a certas capacidades e vias enzimáticas que evoluíram em fotoautótrofos, não encontradas em quimio-heterótrofos (como os seres humanos) (ver Figura 1-6). As plantas (e outros autótrofos) podem reduzir CO_2 atmosférico a trioses e então utilizá-las como precursores para a biossíntese de celulose e de amido, de lipídeos e de proteínas e de muitos outros componentes orgânicos nas células vegetais (**Figura 20-30**). Os seres humanos e outros animais, não tendo essas capacidades sintéticas, são, em última análise, dependentes dos organismos fotossintéticos como fonte de combustíveis reduzidos e precursores orgânicos essenciais para a vida.

As plantas verdes contêm em seus cloroplastos uma maquinaria enzimática única, que catalisa a conversão de CO_2 em compostos orgânicos simples (reduzidos), um processo denominado **assimilação de CO_2** . Esse processo também foi chamado de **fixação de CO_2** ou **fixação de carbono**, mas reservaremos esses termos para a reação específica na qual o CO_2 é incorporado (fixado) em um composto orgânico de três carbonos, uma triose-fosfato, o 3-fosfoglicerato. Esse produto simples da fotossíntese é o precursor de biomoléculas mais complexas, incluindo açúcares, polissacarídeos e os metabólitos derivados deles, todos sintetizados por vias metabólicas semelhantes àsquelas dos tecidos animais. O dióxido de carbono é assimilado por uma via cíclica e seus intermediários-chave são constantemente regenerados. Essa via foi elucidada no início da década de 1950



Melvin Calvin, 1911-1997
[Fonte: Ted Spiegel/Corbis.]

por Melvin Calvin, Andrew Benson e James A. Bassham e é comumente chamada de **ciclo de Calvin** ou, de forma mais descritiva, **ciclo da redução fotossintética do carbono**.

O metabolismo de carboidratos é mais complexo em células vegetais do que em células animais ou em microrganismos não fotossintéticos. Além das vias universais da glicólise e da gliconeogênese, as plantas apresentam as sequências de reações únicas para a redução do CO_2 a trioses-fosfato e a via redutora associada das pentoses-fosfato – e todas essas vias precisam ser coordenadamente reguladas para assegurar a alocação adequada de carbono para a produção de energia e a síntese de amido e sacarose. Enzimas-chave são reguladas, como será visto, por (1) redução de ligações dissulfeto por elétrons que fluem do fotossistema I e por (2) mudanças no pH e na concentração de Mg^{2+} , que resultam da iluminação. Ao analisar outros aspectos do metabolismo dos carboidratos em plantas, também se encontram enzimas moduladas por (3) regulação alostérica convencional por um ou mais metabólitos intermediários e (4) modificação covalente (fosforilação).

A assimilação de dióxido de carbono ocorre em três estágios

O primeiro estágio na assimilação do CO_2 em biomoléculas (**Figura 20-31**) é a reação de fixação de carbono: a condensação de CO_2 com um aceptor de cinco carbonos, a **ribulose-1,5-bisfosfato**, para formar duas moléculas de **3-fosfoglicerato**. No segundo estágio, o 3-fosfoglicerato é reduzido a trioses-fosfato. Ao todo, três moléculas de CO_2 são fixadas a três moléculas de ribulose-1,5-bisfosfato, para formar seis moléculas de gliceraldeído-3-fosfato (18 carbonos) em equilíbrio com a di-hidroxiacetona-fosfato. No terceiro estágio, cinco das seis moléculas de triose-fosfato (15 carbonos) são usadas para regenerar três moléculas de ribulose-1,5-bisfosfato (15 carbonos), o material de partida. A sexta molécula de triose-fosfato, o produto líquido da fotossíntese, pode ser usada para produzir hexo-

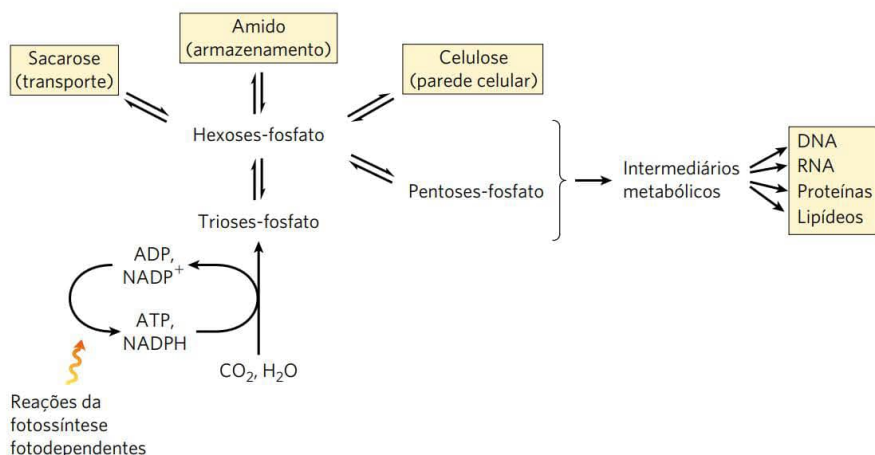


FIGURA 20-30 Assimilação de CO_2 na biomassa em plantas. A síntese de ATP e de NADPH promovida pela luz fornece energia e poder redutor para a fixação de CO_2 em trioses, a partir das quais são sintetizados todos os compostos carbonados da célula vegetal. [Fonte: foto de Brzostowska/Shutterstock.]

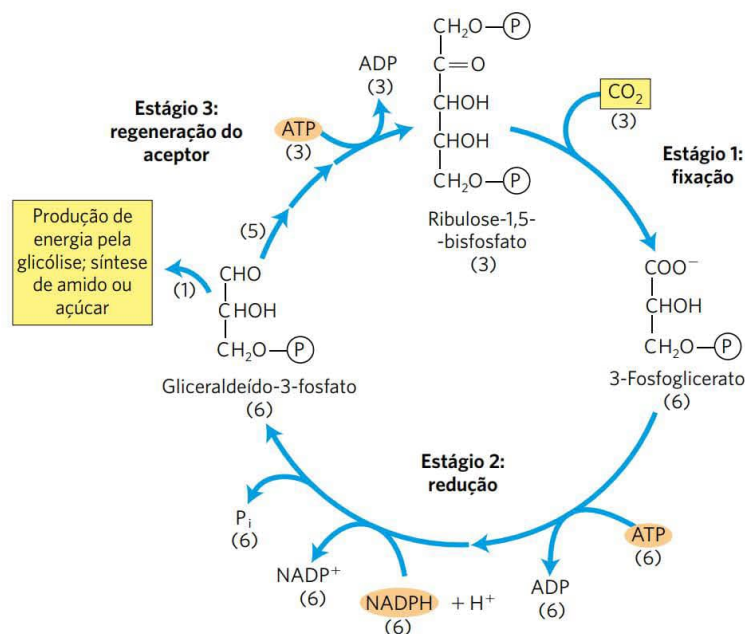


FIGURA 20-31 Os três estágios da assimilação de CO_2 em organismos fotossintéticos. As estequiometrias de três intermediários-chave (números entre parênteses) revelam o destino dos átomos de carbono que entram e saem do ciclo de Calvin, ou ciclo da redução fotossintética do carbono. Conforme mostrado aqui, três CO_2 são fixados para a síntese líquida de uma molécula de gliceraldeído-3-fosfato.

ses para combustível e blocos construtivos, sacarose para transporte para tecidos não fotossintéticos ou amido para armazenamento. Assim, o processo global é cíclico, com a conversão contínua de CO_2 em triose e hexoses-fosfato. A frutose-6-fosfato é um intermediário-chave no estágio 3 da assimilação de CO_2 ; ela se situa em um ponto de ramificação, levando à regeneração da ribulose-1,5-bisfosfato ou à síntese de amido. A via da hexose-fosfato até a pentose-bisfosfato envolve muitas das mesmas reações usadas em células animais para a conversão de pentoses-fosfato em hexoses-fosfato durante a fase não oxidativa da **via das pentoses-fosfato** (ver Figura 14-23). Na assimilação fotossintética de CO_2 , essencialmente o mesmo conjunto de reações opera no outro sentido, convertendo hexoses-fosfato em pentoses-fosfato. Este **ciclo redutor da pentose-fosfato** usa as mesmas enzimas que a via oxidativa e muitas outras enzimas que tornam o ciclo redutor irreversível. Todas as treze enzimas da via estão no estroma do cloroplasto.

Etapa 1: fixação de CO_2 no 3-fosfoglicerato Uma pista importante a respeito da natureza dos mecanismos de assimilação de CO_2 em organismos fotossintéticos surgiu no final da década de 1940. Calvin e colaboradores iluminaram uma suspensão de algas verdes na presença de dióxido de carbono radioativo ($^{14}\text{CO}_2$) por apenas poucos segundos e, então, rapidamente mataram as células, extraíram seus conteúdos e, com a ajuda de métodos cromatográficos, procuraram pelos metabólitos nos quais o carbono marcado aparecia primeiro. O primeiro composto que se tornou marcado foi o 3-fosfoglicerato, com o ^{14}C localizado predominantemente no átomo de carbono da carboxila. Esses experimentos sugeriram que

o 3-fosfoglicerato é um intermediário inicial na fotossíntese. As muitas plantas nas quais esse composto de três carbonos é o primeiro intermediário são chamadas de **plantas C_3** , ao contrário das plantas C_4 , descritas a seguir.

A enzima que catalisa a incorporação do CO_2 em forma orgânica é a **ribulose-1,5-bisfosfato-carboxilase/oxigenase**, nome encurtado para **rubisco**. Como carboxilase, a rubisco catalisa a ligação covalente do CO_2 ao açúcar de 5 carbonos ribulose-1,5-bisfosfato e a clivagem do intermediário instável de seis carbonos resultante, formando duas moléculas de 3-fosfoglicerato, uma das quais aloja o carbono introduzido como CO_2 em seu grupo carboxila (Figura 20-31). A atividade de oxigenase da enzima é discutida na Seção 20.6.

Existem duas formas distintas de rubisco. A forma I é encontrada em plantas vasculares, algas e cianobactérias; a forma II está confinada a certas bactérias fotossintéticas. A rubisco das plantas, a enzima crucial na produção de biomassa a partir do CO_2 , tem uma estrutura complexa da forma I (**Figura 20-32a**), com oito subunidades grandes idênticas (M_r 53.000; codificadas no genoma do cloroplasto, ou plastoma), cada uma contendo um sítio catalítico e oito subunidades pequenas idênticas (M_r 14.000; codificadas no genoma nuclear) de função incerta. A forma II da rubisco das bactérias fotossintéticas tem estrutura mais simples, tendo duas subunidades que, em muitos aspectos, lembram as subunidades grandes da enzima vegetal (Figura 20-32b). A similaridade é consistente com a hipótese endossimbiótica para a origem dos cloroplastos (p. 37). A enzima vegetal tem um número de renovação excepcionalmente baixo; apenas três moléculas de CO_2 são fixadas por segundo por molécula de rubisco a 25°C . Para atingir níveis altos de fi-

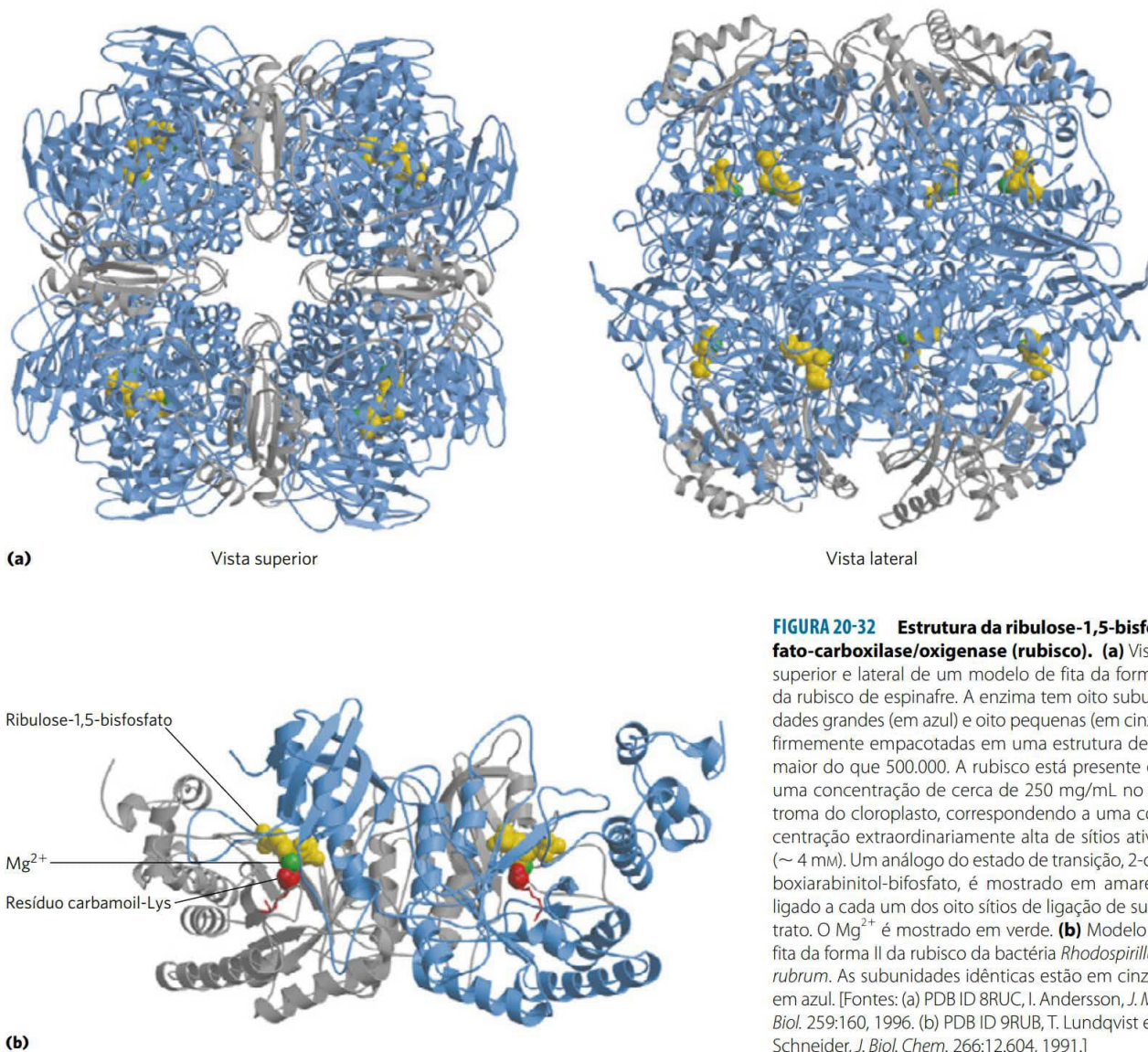


FIGURA 20-32 Estrutura da ribulose-1,5-bisfosfato-carboxilase/oxigenase (rubisco). (a) Vistas superior e lateral de um modelo de fita da forma I da rubisco de espinafre. A enzima tem oito subunidades grandes (em azul) e oito pequenas (em cinza), firmemente empacotadas em uma estrutura de M_r maior do que 500.000. A rubisco está presente em uma concentração de cerca de 250 mg/mL no estroma do cloroplasto, correspondendo a uma concentração extraordinariamente alta de sítios ativos (~ 4 mM). Um análogo do estado de transição, 2-carboxiarabinitol-bifosfato, é mostrado em amarelo, ligado a cada um dos oito sítios de ligação de substrato. O Mg^{2+} é mostrado em verde. (b) Modelo de fita da forma II da rubisco da bactéria *Rhodospirillum rubrum*. As subunidades idênticas estão em cinza e em azul. [Fontes: (a) PDB ID 8RUC, I. Andersson, *J. Mol. Biol.* 259:160, 1996. (b) PDB ID 9RUB, T. Lundqvist e G. Schneider, *J. Biol. Chem.* 266:12.604, 1991.]

xação de CO_2 , portanto, as plantas necessitam de grandes quantidades dessa enzima. De fato, a rubisco constitui quase 50% da proteína solúvel nos cloroplastos e provavelmente seja uma das enzimas mais abundantes na biosfera.

Uma cadeia lateral carbamoilada de Lys com um íon Mg^{2+} ligado é de importância central para o mecanismo proposto para a rubisco vegetal. O íon Mg^{2+} aproxima e orienta os reagentes no sítio ativo (Figura 20-33) e polariza o CO_2 , abrindo

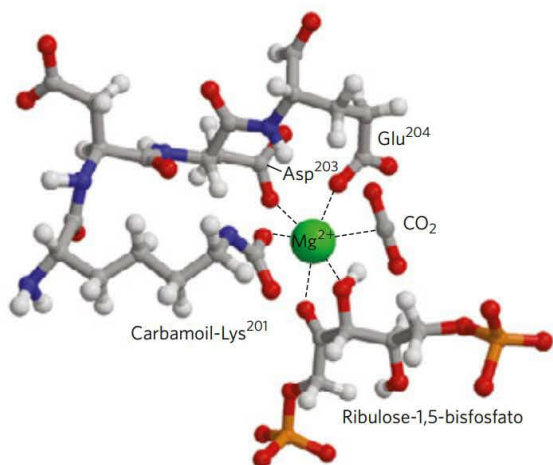
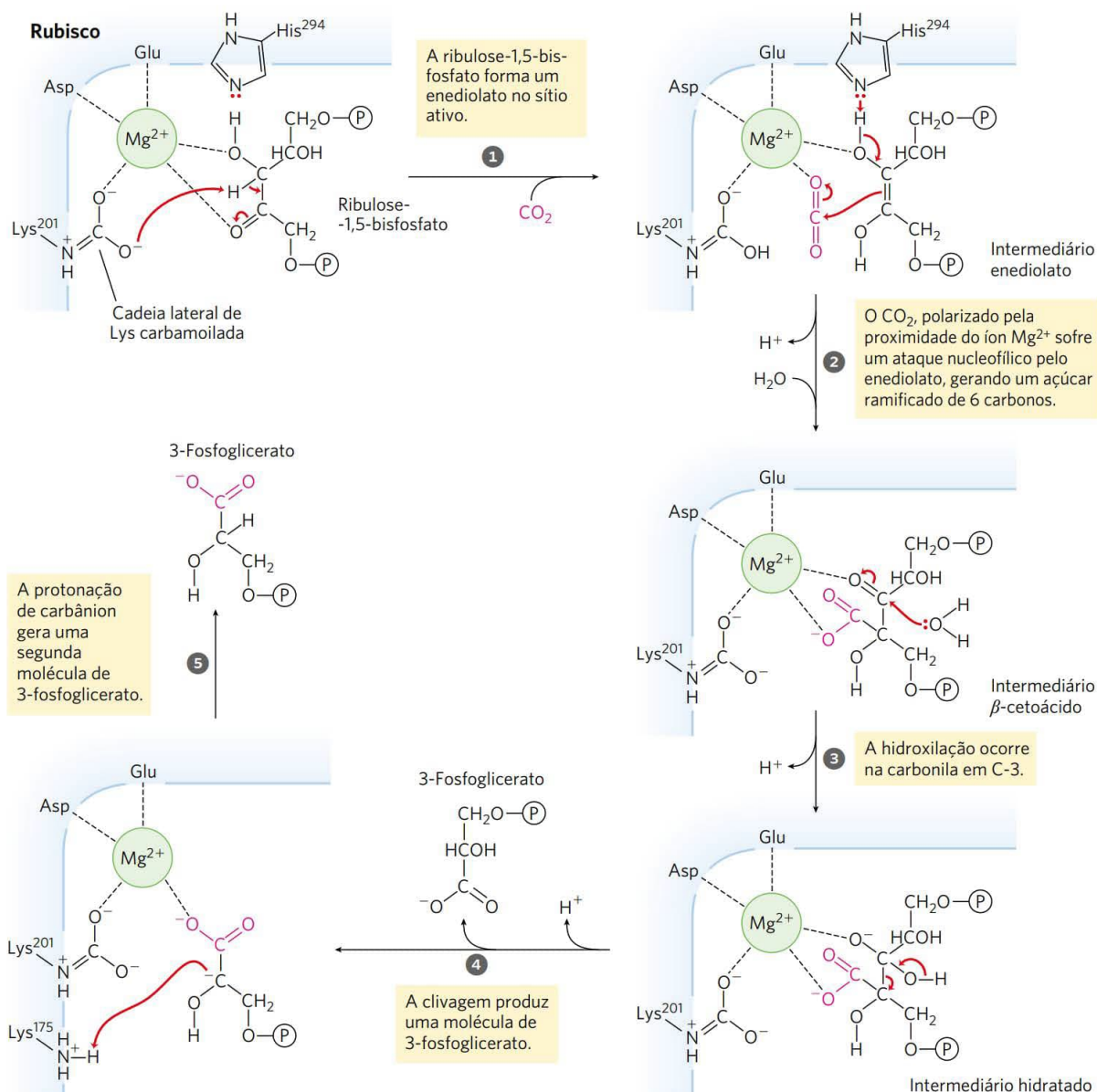


FIGURA 20-33 Papel central do Mg^{2+} no mecanismo catalítico da rubisco. O Mg^{2+} está coordenado em um complexo aproximadamente octaédrico com seis átomos de oxigênio: um oxigênio no carbamato na Lys²⁰¹, dois nos grupos carboxila do Glu²⁰⁴ e do Asp²⁰³, dois em C-2 e C-3 do substrato, ribulose-1,5-bisfosfato; e um no outro substrato, CO_2 . Uma molécula de água ocupa o sítio de ligação do CO_2 nessa estrutura cristalina. Nesta figura, uma molécula de CO_2 é modelada em seu lugar (os resíduos numerados referem-se à enzima do espinafre). [Fonte: derivada de PDB ID 1RXO, T. C. Taylor e I. Andersson, *J. Mol. Biol.* 265:432, 1997.]



MECANISMO-FIGURA 20-34 Primeiro estágio da assimilação de CO₂: atividade de carboxilase da rubisco. A reação de fixação de CO₂ é catalisada pela ribulose-1,5-bisfosfato-carboxilase/oxigenase. A reação global realiza a combinação de um CO₂ e uma ribulose-1,5-bisfosfato para formar duas moléculas de 3-fosfoglicerato, uma das quais contém o átomo de carbono do CO₂ (em vermelho). Transferências adicionais de prótons (não mostradas), envolvendo Lys²⁰¹, Lys¹⁷⁵ e His²⁹⁴, ocorrem em várias destas etapas.

do-o para o ataque nucleofílico pelo intermediário da reação enediolato de cinco carbonos, formado na enzima (**Figura 20-34**). O intermediário de seis carbonos resultante se quebra para produzir duas moléculas de 3-fosfoglicerato.

Como catalisadora do primeiro passo da assimilação fotossintética de CO₂, a rubisco é um alvo primário para regulação. A enzima permanece inativa até que seja carboxilada no grupo ε-amino da Lys²⁰¹ (**Figura 20-35**). A ribulose-1,5-bisfosfato inibe a carboxilação, ligando-se firmemente ao sítio ativo e trancando a enzima na conformação “fechada”, na qual a Lys²⁰¹ é inacessível. A **rubisco-ativase** supera a inibição, promovendo a liberação dependente de

ATP da ribulose-1,5-bisfosfato, expondo o grupo amino da Lys para a carboxilação não enzimática pelo CO₂; segue-se, então, a ligação do Mg²⁺, que ativa a rubisco. Em algumas espécies, a rubisco-ativase é ativada pela luz por meio de um mecanismo *redox* semelhante àquele mostrado na Figura 20-46.

Outro mecanismo de regulação envolve o “inibidor noturno” 2-carboxiarabinitol-1-fosfato, um análogo do estado de transição de ocorrência natural (p. 210), com estrutura similar àquela do intermediário β-cetoácido da reação da rubisco (**Figura 20-34**). Esse composto, sintetizado no escuro em algumas plantas, é um potente inibidor da rubisco carba-

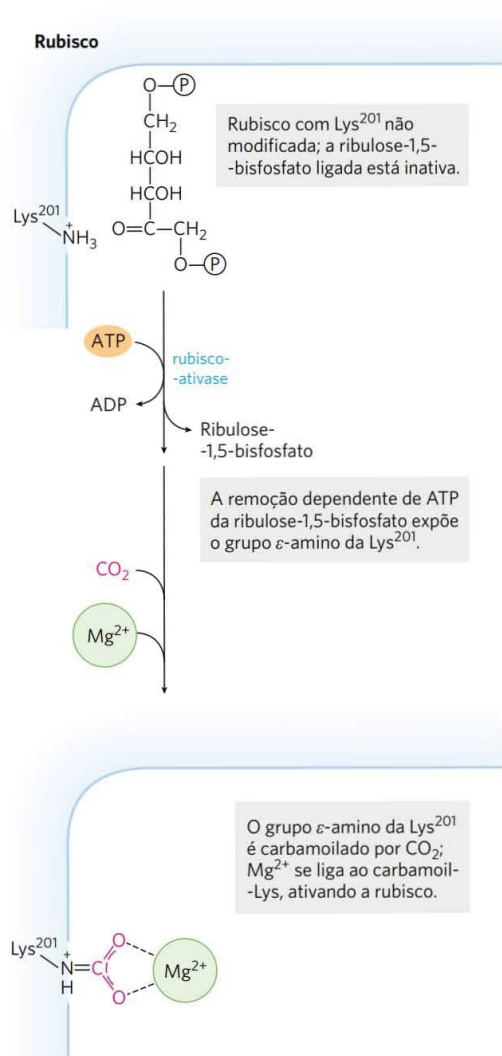
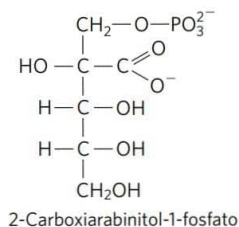


FIGURA 20-35 Papel da rubisco-ativase na carbamidação de Lys²⁰¹ da rubisco. Quando o substrato ribulose-1,5-bisfosfato está ligado ao sítio ativo, a Lys²⁰¹ não está acessível. A rubisco-ativase acopla a hidrólise de ATP à expulsão do açúcar-bisfosfato ligado, expondo a Lys²⁰¹; este resíduo de Lys pode agora ser carbamoiado com CO₂ em uma reação que aparentemente não é mediada por enzimas. O Mg²⁺ é atraído e se liga ao carbamion-Lys negativamente carregado, e a enzima é, então, ativada.

moilada. Ele é degradado quando a luz retorna, ou então é expelido pela rubisco-ativase, ativando a rubisco.



Etapa 2: conversão de 3-fosfoglicerato em gliceraldeído-3-fosfato

O 3-fosfoglicerato formado no estágio 1 é convertido em gliceraldeído-3-fosfato em duas etapas que são essencialmente o inverso das etapas correspondentes na glicólise, com uma exceção: o nucleotídeo cofator para a redução do 1,3-bisfosfoglicerato é NADPH, em vez de NADH (Figura 20-36). O estroma do cloroplasto contém todas as enzimas glicolíticas, exceto a fosfoglicerato-mutase. As enzimas estromais e citosólicas são isoenzimas; ambos os conjuntos de enzimas catalisam as mesmas reações, mas são produtos de genes diferentes.

Na primeira etapa do estágio 2, a **3-fosfoglicerato-cinase** estromal catalisa a transferência de um grupo fosforila do ATP ao 3-fosfoglicerato, produzindo 1,3-bisfosfoglicerato. A seguir, o NADPH doa elétrons em uma redução catalisada pela isoenzima da **gliceraldeído-3-fosfato-de-sidrogenase** específica dos cloroplastos, produzindo gliceraldeído-3-fosfato e P_i. As altas concentrações de NADPH e ATP no estroma do cloroplasto permitem que este par de reações termodinamicamente desfavoráveis proceda na direção da formação do gliceraldeído-3-fosfato. A triose-fosfato-isomerase interconverte então gliceraldeído-3-fosfato e di-hidroxiacetona-fosfato. A maior parte das trioses-fosfato então produzidas é usada para regenerar ribulose-1,5-bisfosfato; o restante é convertido em amido no cloroplasto e armazenado para uso futuro, ou é exportado imediatamente ao citosol e convertido em sacarose para transporte às regiões em crescimento da planta. Em folhas em desenvolvimento, uma porção significativa das trioses-fosfato pode ser degradada pela glicólise para fornecer energia.

Etapa 3: regeneração da ribulose-1,5-bisfosfato a partir das trioses-fosfato

A primeira reação na assimilação de CO₂ em trioses-fosfato consome ribulose-1,5-bisfosfato e, para um fluxo contínuo de CO₂ para carboidrato, ela precisa ser constantemente regenerada. Isso é alcançado por uma série de reações (Figura 20-37) que, junto com os estágios 1 e 2, constituem a via cíclica mostrada na Figura 20-31. O produto da primeira reação de assimilação (3-fosfoglicerato) sofre, então, transformações que regeneram a ribulose-1,5-bisfosfato. Os intermediários nesta via incluem açúcares de três, quatro, cinco, seis e sete carbonos. Na discussão que segue, todos os números das etapas se referem à Figura 20-37.

As etapas 1 e 4 são catalisadas pela mesma enzima, a **aldolase**. Ela catalisa inicialmente a condensação reversível de gliceraldeído-3-fosfato com di-hidroxiacetona-fosfato, produzindo frutose-1,6-bisfosfato (etapa 1); esta é hidrolisada em frutose-6-fosfato e P_i pela frutose-1,6-bisfosfatase (FBPase-1) na etapa 2. A reação é fortemente exergônica e essencialmente irreversível. A etapa 3 é catalisada pela **transcetolase**, que contém tiamina-pirofosfato (TPP) como seu grupo prostético (ver Figura 14-15a) e requer Mg²⁺. A transcetolase catalisa a transferência reversível de um grupo cetol de dois carbonos (CH₂OH—CO—) a partir de um doador cetose-fosfato, a frutose-6-fosfato, para um aceptor aldose-fosfato, o gliceraldeído-3-fosfato (Figura 20-38a, b), formando a

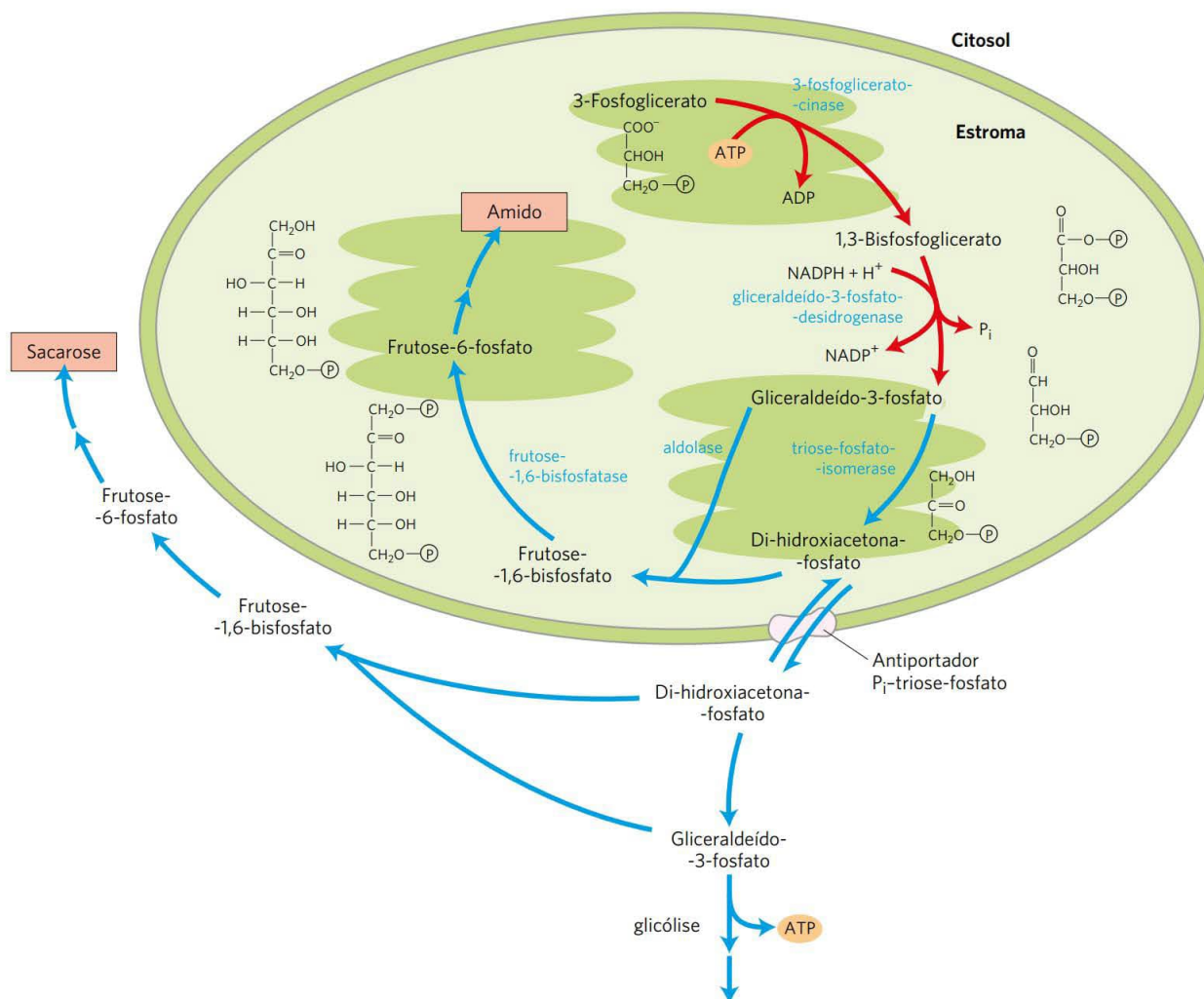


FIGURA 20-36 Segundo estágio da assimilação de CO_2 . O 3-fosfoglicerato é convertido em gliceraldeído-3-fosfato (setas vermelhas). O carbono fixado do gliceraldeído-3-fosfato tem diversos destinos possíveis (setas azuis). A maior parte do gliceraldeído-3-fosfato (10 a 12 moles) é reciclada para formar 6 moles de pentoses-fosfato, como mostrado na Figura 20-37. Os 2 moles restantes de trioses-fosfato, representando o ganho líquido de carbono fixado, são convertidos em sacarose para transporte ou são armazenados no cloroplasto como amido. Neste último, o gliceraldeído-3-fosfato condensa-se com di-hidroxiacetona-fosfato no estroma para formar frutose-1,6-bisfosfato, precursor do amido. Em outras situações, o gliceraldeído-3-fosfato é convertido em di-hidroxiacetona-fosfato, que deixa o cloroplasto por meio de um transportador específico (ver Figura 20-42) e, no citosol, pode ser degradado glicoliticamente para prover energia ou ser usado para formar frutose-6-fosfato e, então, sacarose.

pentose-xilulose-5-fosfato e a tetrose-eritrose-4-fosfato. Na etapa 4, a aldolase age novamente, combinando eritrose-4-fosfato com di-hidroxiacetona-fosfato, para formar a **sedoheptulose-1,7-bisfosfato** de sete carbonos. A sedoheptulose-1,7-bisfosfatase, enzima exclusiva dos plastídeos, converte o bisfosfato a sedoheptulose-7-fosfato (etapa 5); esta é a segunda reação irreversível na via. A transcetolase age então novamente (etapa 6), convertendo sedoheptulose-7-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato em duas pentoses-fosfato (Figura 20-38c). A Figura 20-39 mostra como um fragmento de dois carbonos é temporariamente carregado

no cofator TPP da transcetolase e condensado com os três carbonos do gliceraldeído-3-fosfato na etapa 6.

As pentoses-fosfato formadas nas reações da transcetolase – ribose-5-fosfato e xilulose-5-fosfato – são convertidas em **ribulose-5-fosfato** (etapas 7 e 8), a qual, na etapa final 9 do ciclo, é fosforilada pela ribulose-5-fosfato-cinase, produzindo ribulose-1,5-bisfosfato (Figura 20-40). Essa é a terceira reação muito exergônica da via, uma vez que a energia da ligação fosfato-anidrido no ATP é trocada por uma ligação éster-fosfato na ribulose-1,5-bisfosfato.

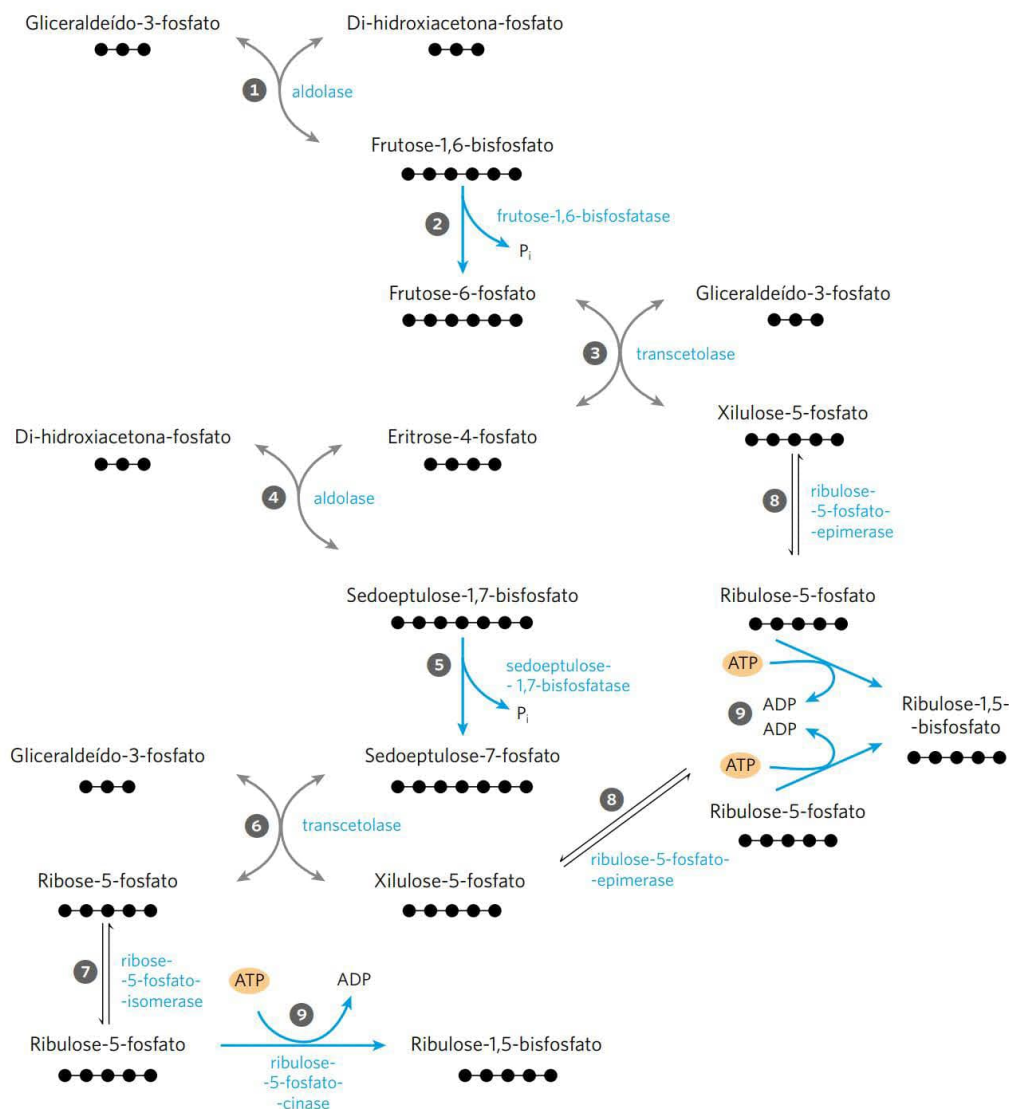
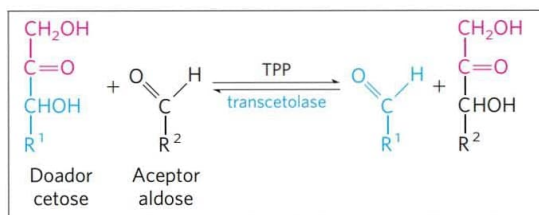


FIGURA 20-37 Terceiro estágio da assimilação de CO₂. Este diagrama esquemático mostra as interconversões das trioses-fosfato e das pentoses-fosfato. Os círculos pretos representam o número de carbonos em cada composto. Os materiais de origem são o gliceraldeído-3-fosfato e a di-hidroxiacetona-fosfato. As reações catalisadas pela aldolase (1 e 4) e pela transcetolase (3 e 6) produzem pentoses-fosfato que são convertidas em ribulose-1,5-bisfosfato – a ribulose-5-fosfato pela ribulose-5-fosfato-isomerase (7) e a xilulose-5-fosfato pela ribulose-5-fosfato-epimerase (8). Na etapa (9), a ribulose-5-fosfato é fosforilada, regenerando ribulose-1,5-bisfosfato. Os passos com setas azuis são exergônicos e tornam o processo global irreversível: 2 frutose-1,6-bisfosfatase, 5 sedoheptulose-bisfosfatase e 9 ribulose-5-fosfato-cinase.

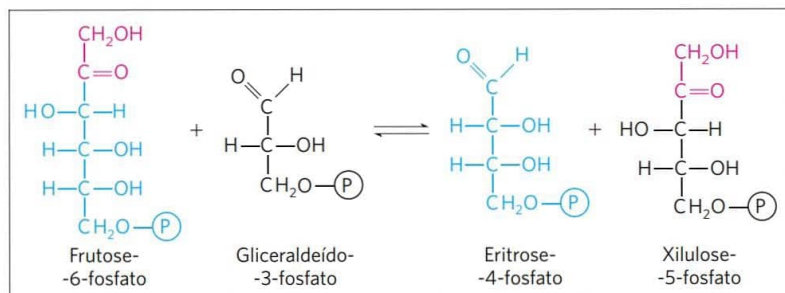
A síntese de cada triose-fosfato a partir do CO₂ requer seis NADPH e nove ATP

O resultado líquido de três voltas do ciclo de Calvin é a conversão de três moléculas de CO₂ e uma molécula de fosfato em uma molécula de triose-fosfato. A estequiometria da via global, do CO₂ à triose-fosfato, com a regeneração da ribulose-1,5-bisfosfato, é mostrada na **Figura 20-41**. Três moléculas de ribulose-1,5-bisfosfato (um total de 15 carbonos) se condensam com 3 CO₂ (3 carbonos) para formar seis moléculas de 3-fosfoglicerato (18 carbonos). Essas seis moléculas de 3-fosfoglicerato são re-

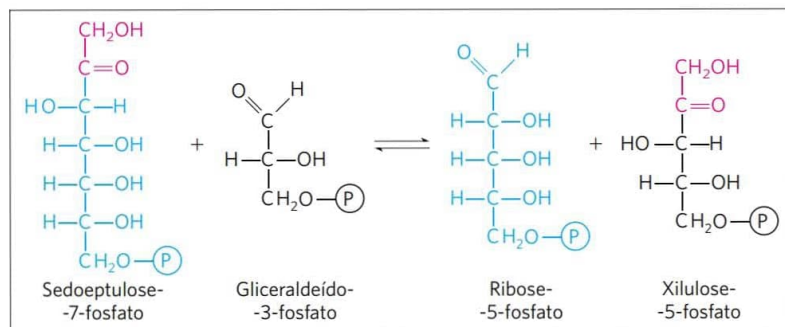
duzidas a seis moléculas de gliceraldeído-3-fosfato (que está em equilíbrio com di-hidroxiacetona-fosfato), com o gasto de seis ATP (na síntese de 1,3-bisfosfoglicerato) e seis NADPH (na redução do 1,3-bisfosfoglicerato a gliceraldeído-3-fosfato). A isoenzima da gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase presente nos cloroplastos pode usar NADPH como seu carreador de elétrons e normalmente funciona na direção da redução do 1,3-bisfosfoglicerato. A isoenzima citosólica usa NAD, da mesma forma que a enzima glicolítica de animais e de outros eucariotos, e, no escuro, essa isoenzima age na glicólise, oxidando o gliceraldeído-3-fosfato. As duas isoenzimas da gliceraldeído-3-



(a)



(b)



(c)

FIGURA 20-38 Reações do ciclo de Calvin catalisadas pela transcetolase. (a) Reação geral catalisada pela transcetolase: a transferência de um grupo de 2 carbonos, temporariamente carregado na TPP ligada à enzima, de um doador cetose a um aceptor aldose. (b) Conversão de uma hexose e de uma triose em açúcares de quatro e cinco carbonos (etapa 3 da Figura 20-37). (c) Conversão de açúcares de sete e de três carbonos em duas pentoses (etapa 6 da Figura 20-37).

-fosfato-desidrogenase, como todas as enzimas, catalisam a reação nos dois sentidos.

Uma molécula de gliceraldeído-3-fosfato é o produto líquido da via de assimilação de carbono. As outras cinco moléculas de triose-fosfato (15 carbonos) são rearranjadas nas etapas de 1 a 6 da Figura 20-37, para formar três moléculas de ribulose-1,5-bisfosfato (15 carbonos). A última etapa nessa conversão requer um ATP por ribulose-1,5-bisfosfato, ou um total de 3 ATP. Assim, em resumo, para cada molécula de triose-fosfato produzida pela assimilação fotossintética de CO_2 , são necessários seis NADPH e nove ATP.

NADPH e ATP são produzidos nas reações fotodependentes da fotossíntese em uma razão (2:3) aproximadamente igual àquela em que são consumidos no ciclo de Calvin. Nove moléculas de ATP são convertidas em ADP e fosfato na geração de uma molécula de triose-fosfato; oito dos fosfatos são liberados com P_i e combinados com 8 ADPs para regenerar ATP. O nono fosfato é incorporado na própria triose-fosfato. Para converter o nono ADP em ATP, uma molécula de P_i precisa ser importada do citosol, conforme será visto a seguir.

No escuro, a produção de ATP e NADPH pela fotofosforilação e a incorporação de CO_2 na triose-fosfato (pelas antiamente chamadas reações do escuro) cessam. As “reações

do escuro” da fotossíntese eram assim chamadas para distingui-las das reações *basicamente* estimuladas pela luz, de transferência de elétrons ao NADP^+ e de síntese de ATP. Na verdade, elas não ocorrem em velocidades significativas no escuro e são, portanto, mais adequadamente chamadas de reações de assimilação de carbono. Mais adiante nesta seção serão descritos os mecanismos de regulação que acionam a assimilação de carbono na luz e a “desligam” no escuro.

O estroma do cloroplasto contém todas as enzimas necessárias para converter as trioses-fosfato produzidas pela assimilação de CO_2 (gliceraldeído-3-fosfato e di-hidroxiacetona-fosfato) em amido, temporariamente armazenado no cloroplasto na forma de grânulos insolúveis. A aldolase condensa as trioses, produzindo frutose-1,6-bisfosfato; a frutose-1,6-bisfosfatase produz frutose-6-fosfato; a fosfoexose-isomerase gera glicose-6-fosfato; e a fosfoglicomutase produz glicose-1-fosfato, o material inicial para a síntese de amido (ver Seção 20.7).

Todas as reações do ciclo de Calvin, exceto aquelas catalisadas pela rubisco, pela sedoheptulose-1,7-bisfosfatase e pela ribulose-5-fosfato-cinase, também ocorrem em tecidos animais. Por não possuírem essas três enzimas, os animais não conseguem realizar a conversão líquida de CO_2 em glicose.

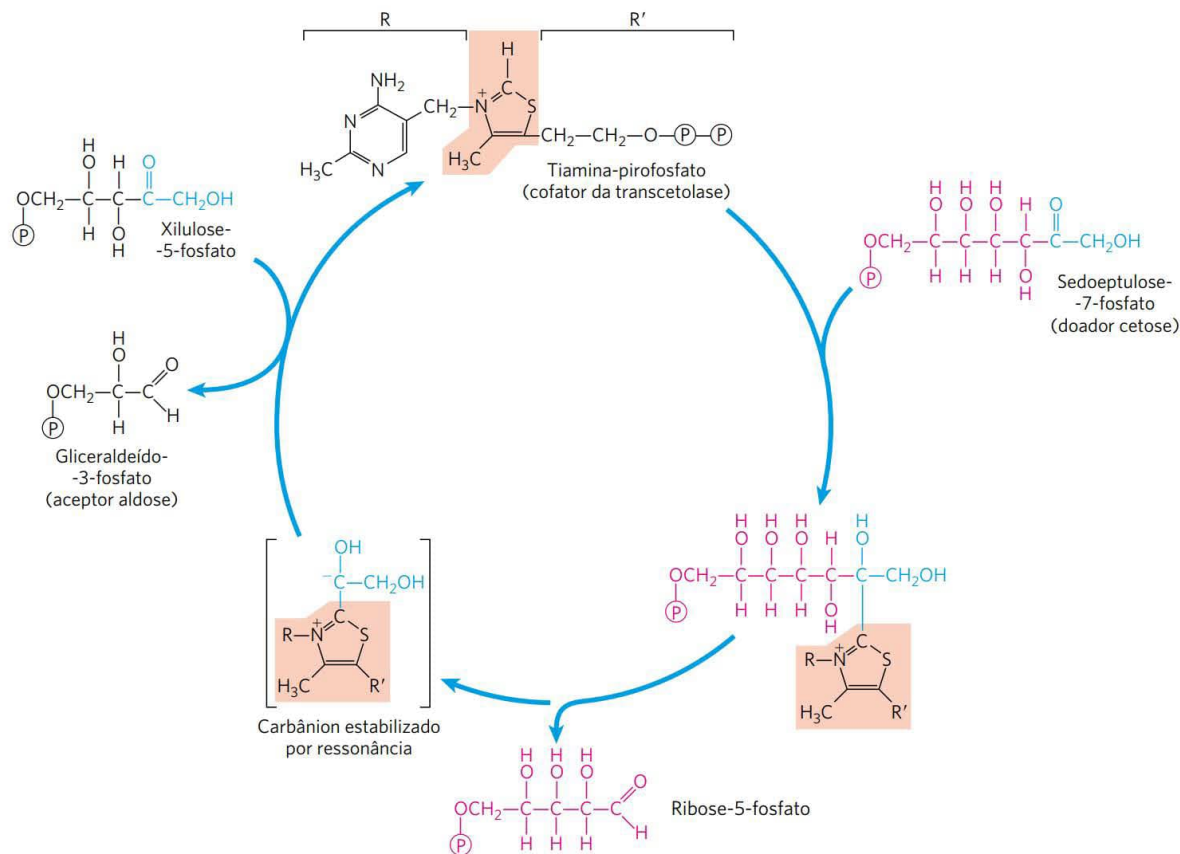


FIGURA 20-39 TPP como cofator para a transketolase. A transketolase transfere um grupo de dois carbonos da sedoheptulose-7-fosfato ao gliceraldeído-3-fosfato, produzindo duas pentoses-fosfato (etapa 6 da Figura 20-37). A tiamina-pirofosfato serve como um carreador temporário da unidade de dois carbonos e como um sugador de elétrons (ver Figura 14-15), para facilitar as reações.

Um sistema de transporte exporta trioses-fosfato do cloroplasto e importa fosfato

A membrana interna do cloroplasto é impermeável à maioria dos compostos fosforilados, incluindo frutose-6-fosfato, gli-

cose-6-fosfato e frutose-1,6-bisfosfato. Entretanto, ela tem um antiportador específico que catalisa a troca, na proporção de um por um, de P_i por triose-fosfato, que pode ser di-hidroxiacetona-fosfato ou 3-fosfoglicerato (**Figura 20-42**; ver também Figura 20-36). Esse antiportador move simulta-

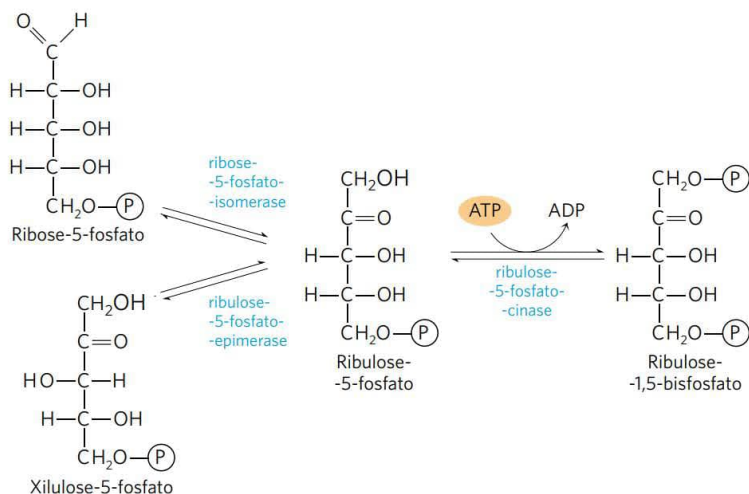


FIGURA 20-40 Regeneração da ribulose-1,5-bisfosfato. O material de partida do ciclo de Calvin, ribulose-1,5-bisfosfato, é regenerado a partir de duas pentoses-fosfato produzidas no ciclo. Esta via envolve a ação de uma isomerase e de uma epimerase e, então, a fosforilação por uma cinase, com ATP como o doador de grupo fosfato (etapas 7, 8 e 9 da Figura 20-37).

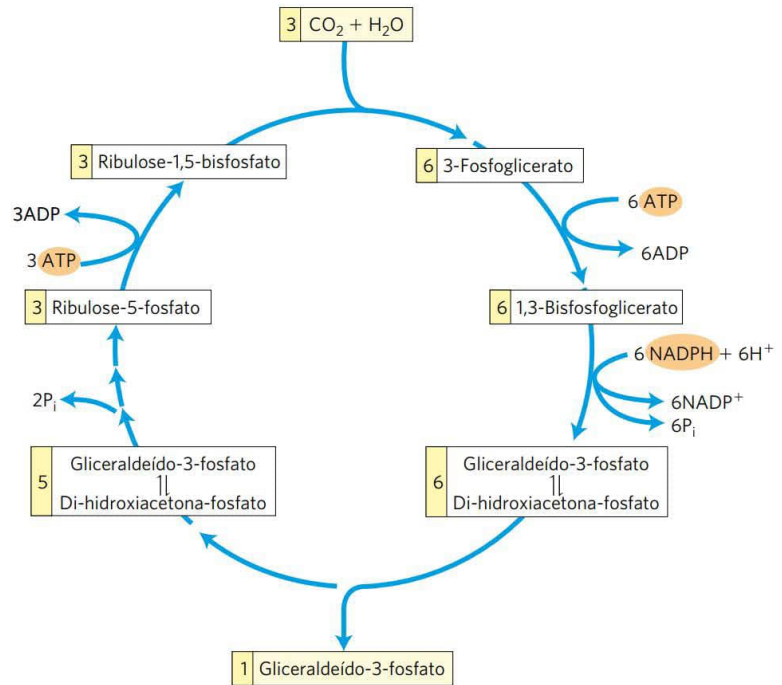


FIGURA 20-41 Estequiometria da assimilação de CO_2 no ciclo de Calvin. Para cada três moléculas de CO_2 fixadas, uma molécula de triose-fosfato (gliceraldeído-3-fosfato) é produzida e nove ATP e seis NADPH são consumidos.

neamente P_i para dentro do cloroplasto, onde ele é usado na fotofosforilação, e triose-fosfato para o citosol, onde ela pode ser usada para sintetizar sacarose, a forma na qual o carbono fixado é transportado para tecidos vegetais distantes.

A síntese de sacarose no citosol e a síntese de amido no cloroplasto são as principais vias pelas quais o excesso de triose-fosfato da fotossíntese é utilizado. A síntese de sacarose (descrita a seguir) libera quatro moléculas de P_i das quatro trioses-fosfato necessárias para produzir sacarose. Para cada molécula de triose-fosfato removida do cloroplasto, um P_i é transportado para o cloroplasto, fornecendo o

nono P_i , mencionado anteriormente, a ser usado na regeneração do ATP. Se essa troca fosse bloqueada, a síntese de trioses-fosfato rapidamente esgotaria o P_i disponível no cloroplasto, diminuindo a síntese de ATP e suprimindo a assimilação de CO_2 na forma de amido.

O sistema antiporte P_i -triose-fosfato também serve para uma função adicional. O ATP e o poder redutor são necessários no citosol para uma variedade de reações sintéticas e que demandam energia. Essas necessidades são satisfeitas em um grau ainda indeterminado pela mitocôndria, mas uma segunda fonte potencial de energia é o ATP e o NADPH

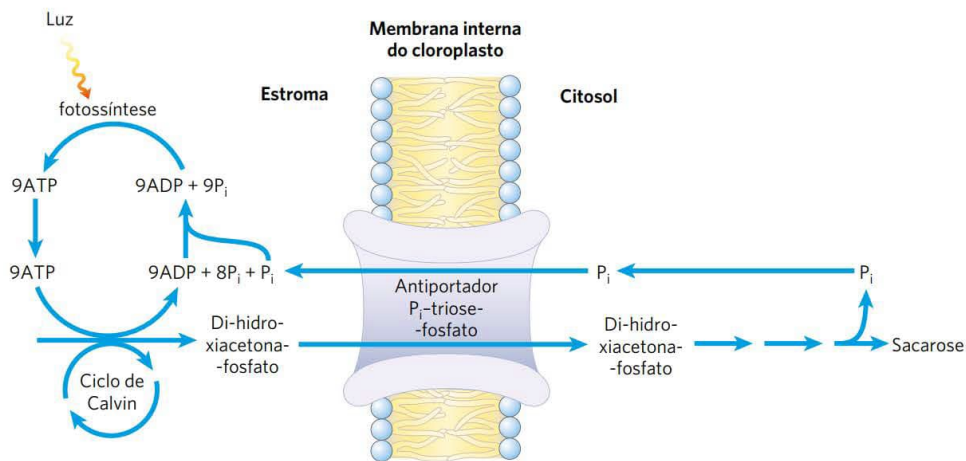


FIGURA 20-42 O sistema antiporte P_i -triose-fosfato da membrana interna do cloroplasto. Este transportador facilita a troca de P_i citosólico por di-hidroxiacetona-fosfato estromal. Os produtos da assimilação fotossintética de carbono são, então, movidos para o citosol, onde servem como ponto de partida para a biossíntese de sacarose, e o P_i necessário para a fotofosforilação é levado para o estroma. Este mesmo antiportador pode transportar 3-fosfoglicerato e age indiretamente na lançadeira de exportação de equivalentes de ATP e de equivalentes redutores (ver Figura 20-43).

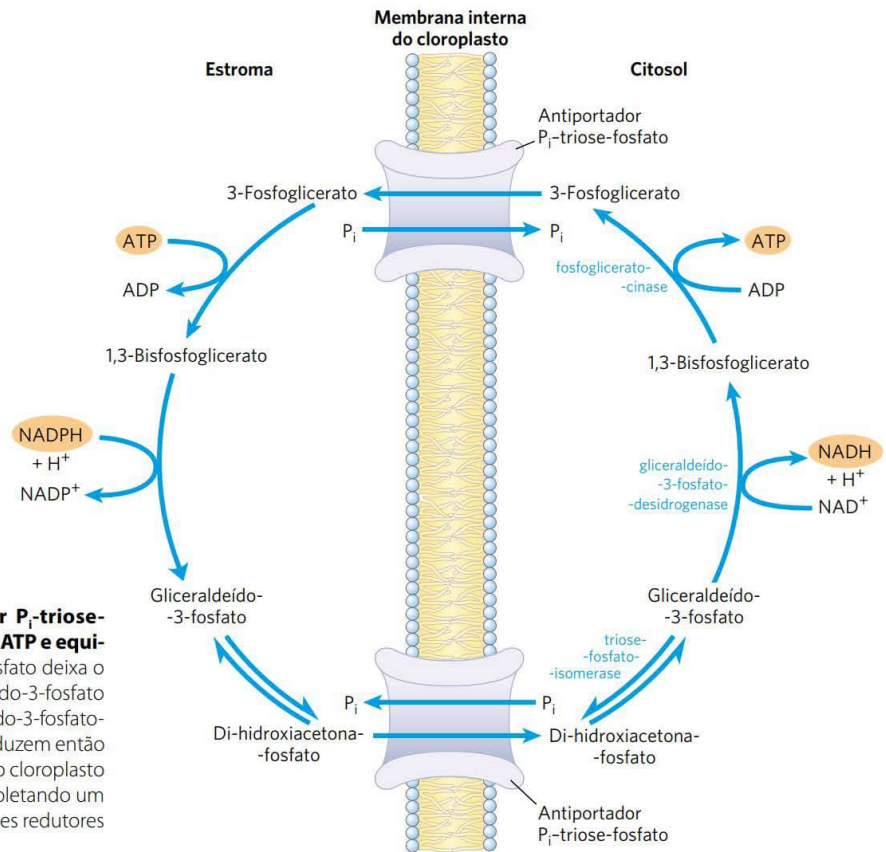


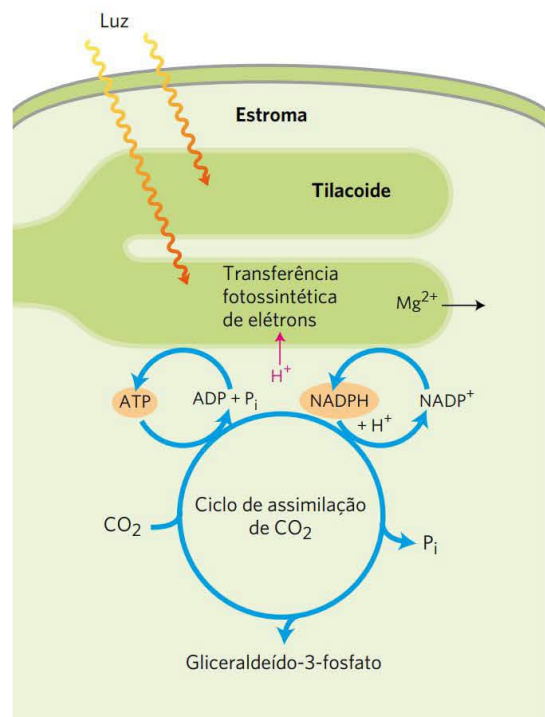
FIGURA 20-43 O papel do antiportador P_i -triose-fosfato no transporte de equivalentes de ATP e equivalentes redutores. A di-hidroxiacetona-fosfato deixa o cloroplasto, sendo convertida em gliceraldeído-3-fosfato no citosol. No citosol, as reações da gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase e da fosfoglicerato-cinase produzem então NADH, ATP e 3-fosfoglicerato. O último volta ao cloroplasto e é reduzido a di-hidroxiacetona-fosfato, completando um ciclo que efetivamente move ATP e equivalentes redutores (NAD(P)H) do cloroplasto ao citosol.

gerados no estroma do cloroplasto durante as reações fotodependentes. No entanto, nem o ATP nem o NADPH podem cruzar a membrana do cloroplasto. O sistema antiporte P_i -triose-fosfato tem o efeito indireto de mover equivalentes de ATP e equivalentes redutores do cloroplasto para o citosol (**Figura 20-43**). A di-hidroxiacetona-fosfato formada no estroma é transportada para o citosol, onde é convertida, por enzimas glicolíticas, em 3-fosfoglicerato, gerando ATP e NADH. O 3-fosfoglicerato entra novamente no cloroplasto, completando o ciclo.

Quatro enzimas do ciclo de Calvin são indiretamente ativadas pela luz

A assimilação redutora de CO_2 requer muito ATP e NADPH, e suas concentrações no estroma aumentam quando os cloroplastos são iluminados (**Figura 20-44**). O transporte de prótons induzido pela luz através da membrana tilacoide

FIGURA 20-44 Fonte de ATP e de NADPH. O ATP e o NADPH produzidos pelas reações fotodependentes são substratos essenciais para a redução do CO_2 . As reações fotossintéticas que produzem ATP e NADPH são acompanhadas pelo movimento de prótons (em vermelho) do estroma para dentro do tilacoide, criando condições alcalinas no estroma. Íons magnésio passam do tilacoide para o estroma, aumentando a $[\text{Mg}^{2+}]$ estromal.



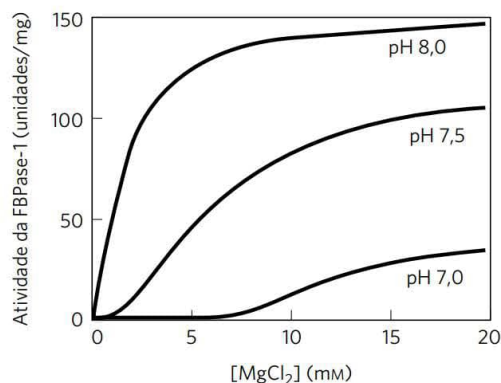


FIGURA 20-45 Ativação da frutose-1,6-bisfosfatase do cloroplasto.

A frutose-1,6-bisfosfatase reduzida (FBPase-1) é ativada pela luz e pela combinação de pH alto e $[Mg^{2+}]$ alta no estroma, ambos resultantes da iluminação. [Fonte: informação obtida de B. Halliwell, *Chloroplast Metabolism: The Structure and Function of Chloroplasts in Green Leaf Cells*, p. 97, Clarendon Press, 1984.]

também causa um aumento no pH do estroma, de aproximadamente 7 para perto de 8, o que é acompanhado por um fluxo de Mg^{2+} do compartimento tilacoide para dentro do estroma, aumentando a $[Mg^{2+}]$ de 1 a 3 mM para 3 a 6 mM. Diversas enzimas do estroma evoluíram de modo a aproveitarem-se dessas condições induzidas pela luz, que sinalizam a disponibilidade de ATP e de NADPH: as enzimas são mais ativas em meio alcalino e em altas $[Mg^{2+}]$. Por exemplo, a ativação da rubisco pela formação de carbamoyl-lisina é mais rápida em pH alcalino, e a alta $[Mg^{2+}]$ estromal favorece a formação do complexo ativo da enzima com Mg^{2+} . A frutose-1,6-bisfosfatase requer Mg^{2+} e é muito dependente do pH (**Figura 20-45**); sua atividade aumenta mais do que 100 vezes quando o pH e a $[Mg^{2+}]$ aumentam durante a iluminação do cloroplasto.

Quatro enzimas do ciclo de Calvin estão sujeitas a um tipo especial de regulação pela luz. A ribulose-5-fosfato-

-cinase, a frutose-1,6-bisfosfatase, a sedoheptulose-1,7-bisfosfatase e a gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase são ativadas pela redução promovida pela luz de ligações dissulfeto entre dois resíduos de Cys fundamentais às suas atividades catalíticas. Quando esses resíduos de Cys apresentam essas ligações dissulfeto (oxidados), as enzimas estão inativas. Essa é a situação normal no escuro. Com a iluminação, os elétrons fluem do fotossistema I à ferredoxina (ver Figura 20-16), a qual passa elétrons a uma pequena proteína solúvel contendo dissulfeto, chamada de **tiorredoxina** (**Figura 20-46**), em uma reação catalisada pela **ferredoxina-tiorredoxina-redutase**. A tiorredoxina reduzida doa elétrons para a redução das ligações dissulfeto das enzimas ativadas pela luz e essas reações redutoras de clivagem são acompanhadas por mudanças conformacionais, que aumentam as atividades enzimáticas. À noite, os resíduos de Cys nas quatro enzimas são reoxidados às suas formas dissulfeto, as enzimas são inativadas, e o ATP não é gasto na assimilação de CO_2 . Em vez disso, o amido sintetizado e armazenado durante o dia é degradado para alimentar a glicólise à noite.

A glicose-6-fosfato-desidrogenase, a primeira enzima na via *oxidativa* das pentoses-fosfato, também é regulada por esse mecanismo de redução promovido pela luz, porém no sentido oposto. Durante o dia, quando a fotossíntese produz muito NADPH, essa enzima não é necessária para a produção de NADPH. A redução de uma ligação dissulfeto crucial por elétrons da ferredoxina *inativa* a enzima.

RESUMO 20.5 Reações de fixação de carbono

- A fotossíntese em eucariotos ocorre nos cloroplastos. Nas reações de assimilação de CO_2 (o ciclo de Calvin), o ATP e o NADPH são usados para reduzir CO_2 a triose-fosfato. Essas reações ocorrem em três estágios: a reação de fixação propriamente dita, catalisada pela rubisco, a redução do 3-fosfoglicerato resultante a gliceraldeído-3-fosfato e a regeneração da ribulose-1,5-bisfosfato a partir das trioses-fosfato.

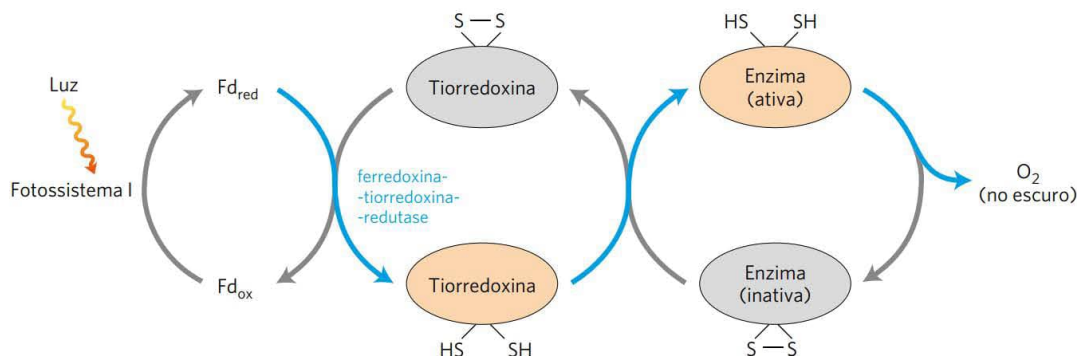
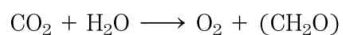


FIGURA 20-46 Ativação pela luz de várias enzimas do ciclo de Calvin. A ativação pela luz é mediada pela tiorredoxina, uma pequena proteína que contém dissulfeto. Na presença de luz, a tiorredoxina é reduzida por elétrons que se movem do fotossistema I, através da ferredoxina (Fd) (setas azuis); a tiorredoxina reduz, então, ligações dissulfeto cruciais em cada uma destas enzimas: sedoheptulose-1,7-bisfosfatase, frutose-1,6-bisfosfatase, ribulose-5-fosfato-cinase e gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, ativando-as. No escuro, os grupos —SH sofrem reoxidação a dissulfeto, inativando as enzimas.

- A rubisco condensa o CO_2 com a ribulose-1,5-bisfosfato, formando uma hexose-bisfosfato instável, que se divide em duas moléculas de 3-fosfoglicerato. A rubisco é ativada por uma modificação covalente (carbamoilação da Lys²⁰¹) catalisada pela rubisco-ativase e é inibida por um análogo natural de estado de transição, cuja concentração aumenta no escuro e diminui durante o dia.
- As isoenzimas estromais das enzimas glicolíticas catalisam a redução de 3-fosfoglicerato a gliceraldeído-3-fosfato; a redução de cada molécula requer um ATP e um NADPH.
- As enzimas estromais, incluindo transcetolase e aldolase, rearranjam os esqueletos carbonados das trioses-fosfato, gerando intermediários de três, quatro, cinco, seis e sete carbonos, e, por fim, geram pentoses-fosfato. As pentoses-fosfato são convertidas em ribulose-5-fosfato, que é, então, fosforilada, produzindo ribulose-1,5-bisfosfato para completar o ciclo de Calvin.
- O custo de fixar três CO_2 em uma triose-fosfato é de nove ATP e seis NADPH, providos pelas reações fotodependentes da fotossíntese.
- Um antiportador na membrana interna do cloroplasto troca P_i no citosol por 3-fosfoglicerato ou di-hidroxiacetona-fosfato, produzidos pela assimilação de CO_2 no estroma. A oxidação da di-hidroxiacetona-fosfato no citosol gera ATP e NADH, movendo, assim, ATP e equivalentes redutores do cloroplasto ao citosol.
- Quatro enzimas do ciclo de Calvin são ativadas indiretamente pela luz, sendo inativas no escuro, de forma que a síntese de hexoses não compete com a glicólise – que é necessária para fornecer energia no escuro.

20.6 Fotorrespiração e as vias C_4 e CAM

Conforme foi visto, as células fotossintéticas produzem O_2 (pela quebra da água) durante as reações promovidas pela luz e usam CO_2 durante os processos independentes de luz, de forma que a mudança líquida de gases durante a fotossíntese é a captação de CO_2 e a liberação de O_2 :



No escuro, as plantas também realizam a **respiração mitocondrial**, a oxidação de substratos até CO_2 e a conversão de O_2 em H_2O . Existe ainda um outro processo em plantas que, da mesma forma que a respiração mitocondrial, consome O_2 e produz CO_2 e, assim como a fotossíntese, é promovido pela luz. Esse processo, a **fotorrespiração**, é um lado dispendioso da fotossíntese, resultado da falta de especificidade da enzima rubisco. Esta seção descreve essa reação paralela e as estratégias que as plantas utilizam para minimizar suas consequências metabólicas.

A fotorrespiração resulta da atividade de oxigenase da rubisco

A rubisco não tem especificidade absoluta pelo CO_2 como substrato. O oxigênio molecular (O_2) compete com o CO_2

no sítio ativo e, cerca de uma vez a cada três ou quatro rodadas, a rubisco catalisa a condensação do O_2 com a ribulose-1,5-bisfosfato para formar 3-fosfoglicerato e **2-fosfoglicolato** (Figura 20-47), um produto metabolicamente inútil. Essa é a atividade de oxigenase, atribuída no nome completo da enzima: ribulose-1,5-bisfosfato-carboxilase/oxigenase. Como resultado da reação com O_2 , não ocorre fixação de carbono, e essa reação parece ser desvantajosa para a célula; resgatar os carbonos do 2-fosfoglicolato (pela via descrita a seguir) consome quantidades significativas de energia celular e libera CO_2 previamente fixado.

Considerando que a reação com o oxigênio é deletéria para o organismo, por que a evolução da rubisco produziu um sítio ativo incapaz de diferenciar bem o CO_2 do O_2 ? Talvez boa parte dessa evolução tenha ocorrido antes da época em que a produção de O_2 pelos organismos fotos-

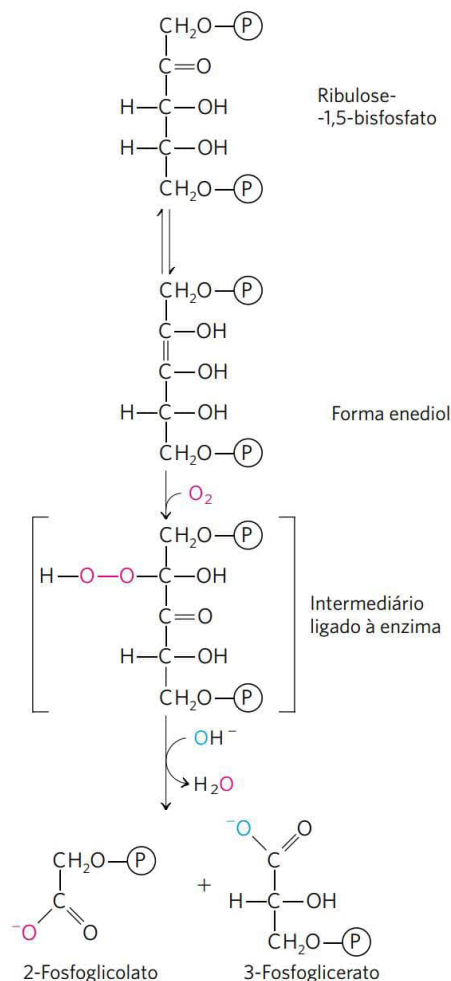
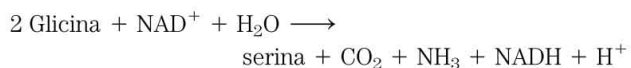


FIGURA 20-47 Atividade de oxigenase da rubisco. A rubisco pode incorporar O_2 em vez de CO_2 na ribulose-1,5-bisfosfato. O intermediário instável então formado se divide em 2-fosfoglicolato (reciclado conforme descrito na Figura 20-48) e 3-fosfoglicerato, que pode reingressar no ciclo de Calvin.

sintéticos começou a elevar o conteúdo de oxigênio na atmosfera, cerca de 2,5 bilhões de anos atrás. Antes dessa época, não havia pressão seletiva para que a rubisco diferenciasse o CO_2 do O_2 . A K_m para o CO_2 é cerca de $9 \mu\text{M}$, e a do O_2 é de aproximadamente $350 \mu\text{M}$. A atmosfera moderna contém cerca de 20% de O_2 e apenas 0,04% de CO_2 , de forma que uma solução aquosa em equilíbrio com o ar à temperatura ambiente contém cerca de $250 \mu\text{M}$ de O_2 e $11 \mu\text{M}$ de CO_2 – concentrações que permitem “fixação” significativa de O_2 pela rubisco e, portanto, um desperdício significativo de energia. A dependência das solubilidades do O_2 e do CO_2 em relação à temperatura é tal que, em temperaturas mais elevadas, a razão de O_2 para CO_2 na solução aumenta. Além disso, a afinidade da rubisco por CO_2 diminui com o aumento da temperatura, exacerbando sua tendência de catalisar a reação de desperdício da oxigenase. À medida que o CO_2 é consumido nas reações de assimilação, a razão de O_2 para CO_2 nos espaços de aeração da folha aumenta, favorecendo ainda mais a reação da oxigenase.

A via de recuperação do fosfoglicolato é onerosa

A **via do glicolato** converte duas moléculas de 2-fosfoglicolato em uma molécula de serina (três carbonos) e uma molécula de CO_2 (Figura 20-48). No cloroplasto, uma fosfatase converte 2-fosfoglicolato em glicolato, o qual é exportado ao peroxissomo. Lá, o glicolato é oxidado pelo oxigênio molecular, e o aldeído resultante (glioxilato) sofre transaminação, produzindo glicina. O peróxido de hidrogênio formado como subproduto da oxidação do glicolato é tornado inócuo por peroxidases no peroxissomo. A glicina passa do peroxissomo para a matriz mitocondrial, onde sofre descarboxilação oxidativa pelo complexo da glicina-decarboxilase, enzima semelhante em estrutura e mecanismo a dois complexos mitocondriais já estudados: o complexo da piruvato-desidrogenase e o complexo da α -cetoglutarato-desidrogenase (Capítulo 16). O **complexo da glicina-decarboxilase** oxida a glicina a CO_2 e NH_3 , com a concomitante redução de NAD^+ a NADH e a transferência do carbono remanescente da glicina para o cofator tetra-hidrofolato (Figura 20-49). A unidade de um carbono carregada no tetra-hidrofolato é então transferida a uma segunda molécula de glicina pela serina-hidroximetil-transferase, produzindo serina. A reação líquida catalisada pelo complexo da glicina-decarboxilase e pela serina-hidroximetil-transferase é



A serina é convertida em hidroxipiruvato, em glicerato e, finalmente, em 3-fosfoglicerato, que é usado para regenerar a ribulose-1,5-bisfosfato, completando o longo e oneroso ciclo (Figura 20-48).

Sob luz solar brilhante, o fluxo pela via de recuperação do glicolato pode ser muito alto, produzindo cerca de cinco vezes mais CO_2 do que costuma ser produzido por todas as oxidações do ciclo do ácido cítrico. Para gerar esse gran-

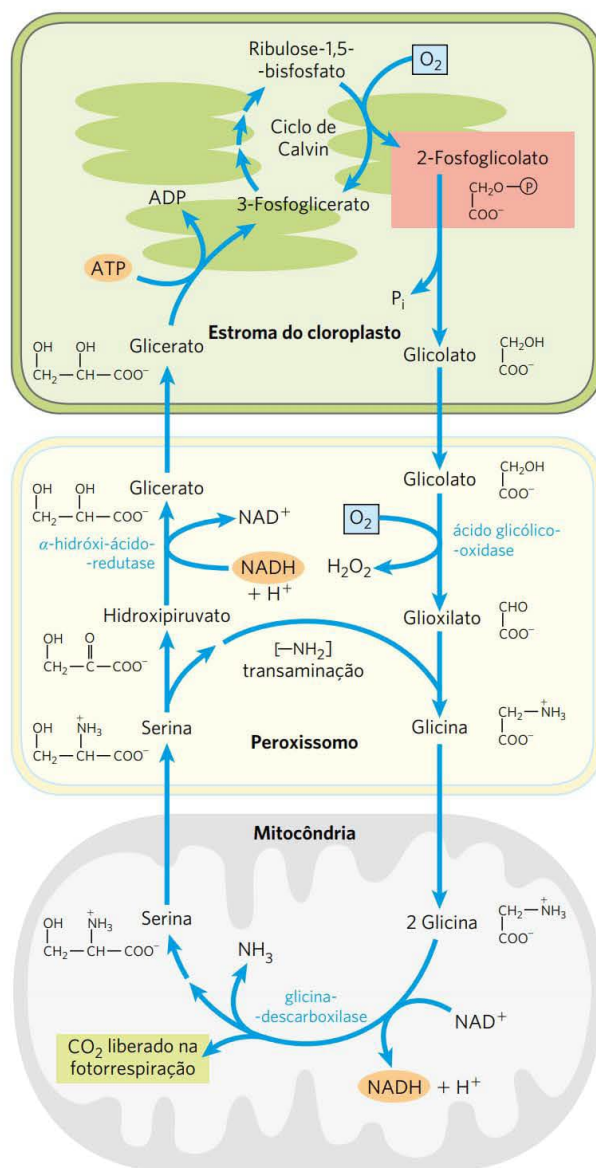


FIGURA 20-48 Via do glicolato. Esta via, que resgata o 2-fosfoglicolato (sombreado em cor-de-rosa) por sua conversão em serina e, por fim, em 3-fosfoglicerato, envolve três compartimentos celulares. O glicolato formado pela desfosforilação do 2-fosfoglicolato nos cloroplastos é oxidado a glioxilato, sendo, após, transaminado nos peroxissomos, produzindo glicina. Nas mitocôndrias, duas moléculas de glicina condensam-se para formar serina e CO_2 , o qual é liberado durante a fotorrespiração (sombreado em verde). Esta reação é catalisada pela glicina-decarboxilase, enzima presente em concentrações muito elevadas nas mitocôndrias de plantas C_3 (ver texto). A serina é convertida em hidroxipiruvato e, então, em glicerato nos peroxissomos; o glicerato retorna aos cloroplastos para ser fosforilado, juntando-se novamente ao ciclo de Calvin. O oxigênio (sombreado em azul) é consumido em duas etapas durante a fotorrespiração.

de fluxo, as mitocôndrias contêm grandes quantidades do complexo da glicina-decarboxilase: as quatro proteínas do complexo compreendem metade de toda a proteína na

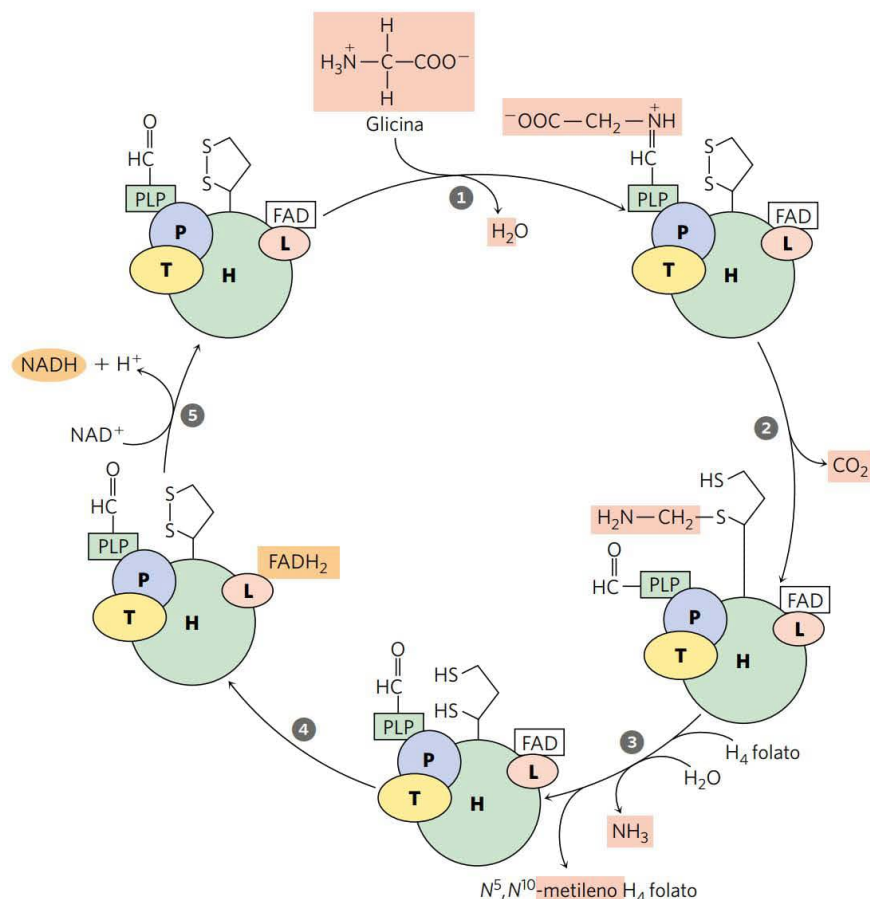


FIGURA 20-49 O sistema da glicina-descarboxilase. A glicina-descarboxilase em mitocôndrias vegetais é um complexo de quatro tipos de subunidades, com a estequiometria $P_4H_{27}T_9L_2$. A proteína H tem um resíduo de ácido lipoico covalentemente ligado, que pode sofrer oxidação reversível. ① Uma base de Schiff é formada entre o piridoxal-fosfato (PLP) e a glicina, catalisada pela proteína P (assim denominada em função de seu PLP ligado). ② A proteína P catalisa a descarboxilação oxidativa da glicina, liberando CO_2 ; o grupo metilamina remanescente é ligado a um dos grupos $-SH$ do ácido lipoico reduzido. ③ A proteína T (que usa tetra-hidrofolato [H_4 -folato] como cofator) agora libera NH_3 da porção metilamina e transfere o fragmento remanescente de um carbono para o tetra-hidrofolato, produzindo N^5, N^{10} -metilenotetra-hidrofolato. ④ A proteína L oxida os dois grupos $-SH$ do ácido lipoico a um dissulfeto, passando elétrons através do FAD até o NAD^+ , completando, assim, o ciclo. O N^5, N^{10} -metilenotetra-hidrofolato formado neste processo é usado pela serina-hidroximetil-transferase para converter uma molécula de glicina em serina, regenerando o tetra-hidrofolato, que é essencial para a reação catalisada pela proteína T. A subunidade L da glicina-descarboxilase é idêntica à di-hidrolipoil-desidrogenase (E_3) da piruvato-desidrogenase e da α -cetoglutarato-desidrogenase (ver Figura 16-6).

matriz mitocondrial em folha de plantas de ervilha e de espinafre. Em partes não fotossintéticas da planta, como nos tubérculos de batata, as mitocôndrias têm concentrações muito baixas do complexo da glicina-descarboxilase.

As atividades combinadas da rubisco-oxigenase e da via de recuperação do glicolato consomem O_2 e produzem CO_2 – daí o nome fotorrespiração. Talvez os nomes mais adequados para essa via fossem **ciclo oxidativo fotossintético do carbono** ou **ciclo C_2** , nomes que não induzem a comparações com a respiração nas mitocôndrias. Ao contrário da respiração mitocondrial, a “fotorrespiração” não conserva energia e pode, na verdade, inibir a formação líquida de biomassa em até 50%. Essa ineficiência levou a adaptações evolutivas nos processos de assimilação de carbono, parti-

cularmente em plantas que evoluíram em climas quentes. A aparente ineficiência da rubisco e seu efeito em limitar a produção de biomassa inspiraram esforços de engenharia genética para fabricar uma rubisco “melhor”, mas esse objetivo ainda não foi alcançado (Quadro 20-1).

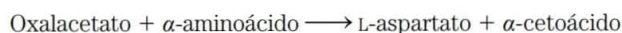
Em plantas C_4 , a fixação do CO_2 e a atividade da rubisco são separadas espacialmente

Em muitas plantas que crescem nos trópicos (e em culturas de zonas temperadas nativas dos trópicos, como milho, cana-de-açúcar e sorgo), evoluiu um mecanismo que contornou o problema da fotorrespiração dispendiosa. A etapa na qual o CO_2 é fixado em um produto de três carbonos, o 3-fosfoglicerato, é precedida por várias etapas, uma das

quais é a fixação temporária de CO_2 em um composto de quatro carbonos. As plantas que utilizam esse processo são chamadas de **plantas C₄** e o processo de assimilação é denominado **metabolismo C₄** ou **via C₄**. As plantas que utilizam o método de assimilação de carbonos descrito até agora, em que a *primeira etapa* é a reação do CO_2 com a ribulose-1,5-bisfosfato para formar 3-fosfoglicerato, são chamadas de plantas C₃.

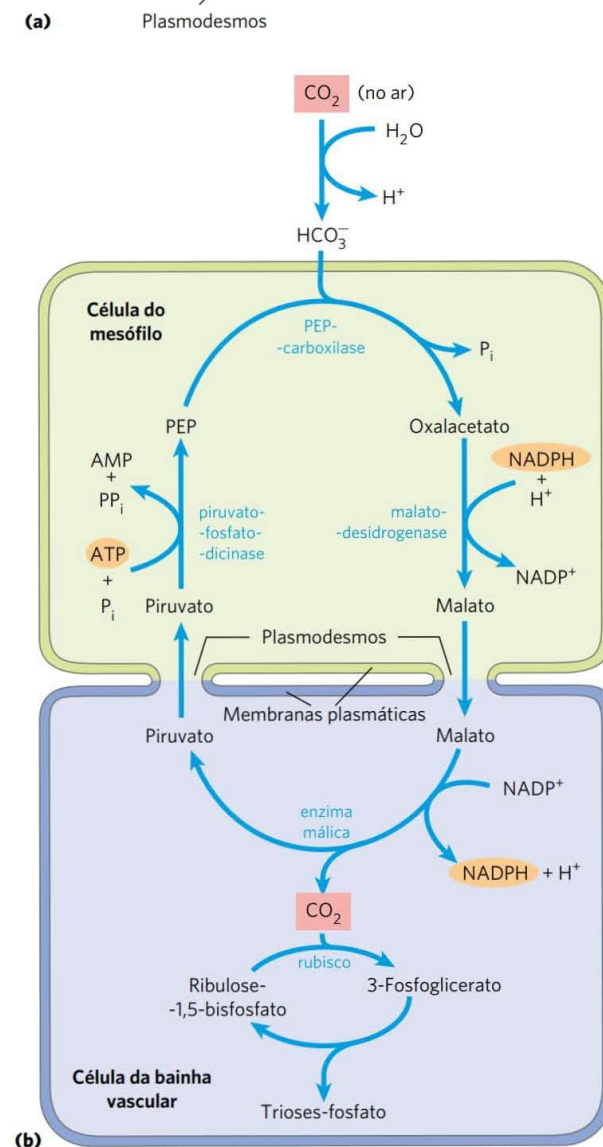
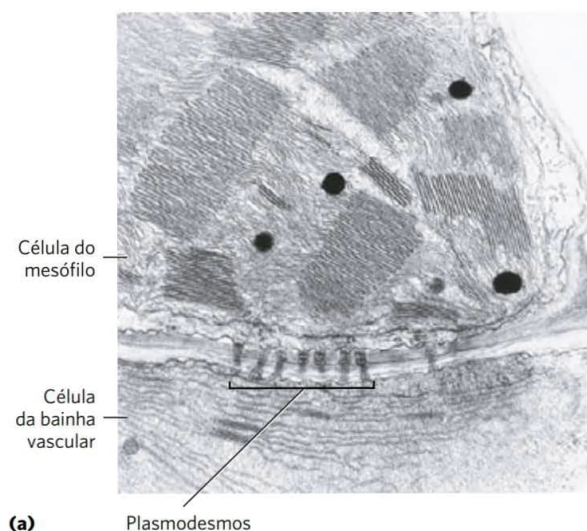
As plantas C₄, que geralmente crescem em regiões de grande intensidade luminosa e altas temperaturas, têm várias características importantes: velocidade fotossintética alta, altas taxas de crescimento, baixas taxas de fotorrespiração, baixas taxas de perda de água e uma estrutura foliar especializada. A fotossíntese nas folhas de plantas C₄ envolve dois tipos de células: células do mesófilo e células da bainha vascular (**Figura 20-50a**). Existem três variantes do metabolismo C₄, estudadas na década de 1960 por Marshall Hatch e Rodger Slack (Figura 20-50b).

Em plantas de origem tropical, o primeiro intermediário no qual o $^{14}\text{CO}_2$ é fixado é o oxalacetato, um composto de quatro carbonos. Essa reação, que ocorre no citosol das células do mesófilo foliar, é catalisada pela **fosfoenolpiruvato-carboxilase**, para a qual o substrato é o HCO_3^- , e não o CO_2 . O oxalacetato então formado é reduzido a malato à custa de NADPH (como mostrado na Figura 20-50b), ou convertido em aspartato por transaminação:



O malato ou o aspartato formados nas células do mesófilo passam então para as células vizinhas da bainha vascular através dos plasmodesmos, canais forrados de proteínas que conectam duas células vegetais e que proporcionam uma via para o movimento de metabólitos e mesmo de pequenas proteínas entre as células. Nas células da bainha vascular, o malato é oxidado e descarboxilado para gerar piruvato e CO_2 pela ação da **enzima málica**, reduzindo NADP^+ . Em plantas que usam o aspartato como carreador de CO_2 , o aspartato que chega nas células da bainha vascular é transaminado para formar oxalacetato, sendo, a seguir, reduzido a malato; então, o CO_2 é liberado pela enzima málica ou pela PEP-carboxicinas. Conforme mostram experimentos de marcação, o CO_2 liberado nas células da bainha vascular é a mesma molécula de CO_2 originalmente fixada no oxalacetato nas células do mesófilo. Este CO_2 é agora novamente fixado, desta vez pela rubisco, em uma reação que é exatamente a mesma que ocorre em plantas C₃: incorporação de CO_2 no C-1 do 3-fosfoglicerato.

FIGURA 20-50 Assimilação de carbono em plantas C₄. A via C₄, envolvendo células do mesófilo e células da bainha vascular, predomina em plantas de origem tropical. (a) Micrografia eletrônica mostrando cloroplastos de células vizinhas do mesófilo e da bainha vascular. A célula da bainha vascular contém grânulos de amido. Plasmodesmos conectando as duas células são visíveis. (b) Via C₄ de assimilação de CO_2 , que ocorre por meio de um intermediário de quatro carbonos. [Fonte: (a) Dr. Ray Evert, University of Wisconsin-Madison, Department of Botany.]



QUADRO 20-1 Poderá a engenharia genética de organismos fotossintéticos aumentar sua eficiência?

Três problemas mundiais urgentes despertaram atenção séria para a possibilidade de se modificar as plantas para que elas sejam mais eficientes na conversão da luz solar em biomassa: o “efeito estufa” do aumento do CO_2 atmosférico sobre a mudança climática global, o declínio no suprimento de petróleo para o fornecimento de energia e a necessidade de mais e melhores alimentos para a população mundial em crescimento.

A concentração de CO_2 na atmosfera terrestre tem aumentado continuamente ao longo dos últimos 50 anos (Figura Q-1) pelo efeito combinado do uso de combustíveis fósseis para energia e pela derrubada e queima de florestas tropicais para permitir o uso da terra na agricultura. À medida que o CO_2 atmosférico aumenta, a atmosfera absorve mais do calor irradiado da superfície da terra e irradia mais em direção à superfície do planeta (e em todas as outras direções). A retenção de calor aumenta a temperatura na superfície da terra; esse é o efeito estufa. Uma forma de limitar o aumento no CO_2 atmosférico seria

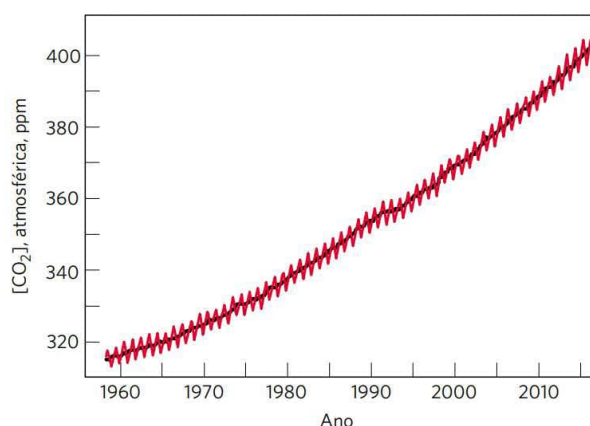


FIGURA Q-1 A concentração de CO_2 na atmosfera medida no Observatório Mauna Loa, no Havaí. [Fonte: dados da National Oceanic and Atmospheric Administration e do Scripps Institution of Oceanography CO_2 Program.]

criar plantas ou microrganismos com maior capacidade de sequestro de CO_2 .

A quantidade estimada de carbono total em todos os sistemas terrestres (atmosfera, solo e biomassa) é de cerca de 3.200 gigatoneladas (GT) – 3.200 bilhões de toneladas métricas. A atmosfera contém outras 760 GT de CO_2 .

O fluxo de carbono por esses reservatórios terrestres (Figura Q-2) deve-se em grande parte às atividades fotossintéticas das plantas e às atividades de degradação dos microrganismos. As plantas fixam cerca de 123 GT de carbono por ano e liberam imediatamente cerca de metade disso para a atmosfera enquanto respiram. A maior parte do restante é gradualmente liberada para a atmosfera pela ação microbiana sobre a matéria vegetal morta, mas biomassa é sequestrada em plantas lenhosas e árvores por décadas ou séculos. O fluxo antropogênico de carbono, a quantidade de CO_2 liberada na atmosfera por atividades humanas, é de 9 GT por ano – pequena comparada com a biomassa total, mas suficiente para desequilibrar o balanço da natureza em direção a um aumento de CO_2 na atmosfera. Estima-se que as florestas da América do Norte sequestram 0,7 GT de carbono anualmente, o que representa um décimo da produção anual *global* de CO_2 a partir dos combustíveis fósseis. É evidente que a preservação das florestas e o reflorestamento são maneiras efetivas para limitar o fluxo de CO_2 de volta para a atmosfera.

Uma segunda abordagem para limitar o aumento do CO_2 atmosférico, ao mesmo tempo em que também se considera a necessidade de substituir combustíveis fósseis em esgotamento, é usar biomassa renovável como fonte de etanol para substituir combustíveis fósseis em motores de combustão interna. Isso reduz o movimento *unidirecional* de carbono dos combustíveis fósseis para o conjunto atmosférico de CO_2 , substituindo-o pelo fluxo *cíclico* de CO_2 do etanol para CO_2 e de volta para a biomassa. Quando milho, trigo ou certo tipo de capim (*Panicum virgatum*) sofrem fermentação até produzir etanol para combustível, todo o aumento em produção de biomassa alcançado por uma fotossíntese mais eficiente

O piruvato formado pela descarboxilação do malato nas células da bainha vascular é transferido de volta às células do mesófilo, onde é convertido em PEP por uma reação enzimática incomum, catalisada pela **piruvato-fosfato-dicinase** (Figura 20-50b). A enzima é denominada dicinase porque duas moléculas diferentes são simultaneamente fosforiladas por uma molécula de ATP: o piruvato é fosforilado, produzindo PEP, e um fosfato é fosforilado, originando pirofosfato. O pirofosfato é posteriormente hidrolisado em fosfato, de forma que dois grupos fosfato de alta energia do ATP são usados na regeneração do PEP. O PEP está agora pronto para receber outra molécula de CO_2 na célula do mesófilo.

A PEP-carboxilase nas células do mesófilo tem alta afinidade por HCO_3^- (que é favorecido em relação ao CO_2 em solução aquosa) e pode fixar CO_2 de maneira mais eficiente do que a rubisco. Ao contrário da rubisco, ela não usa O_2 como substrato alternativo, de forma que não há competição entre CO_2 e O_2 . A reação da PEP-carboxilase serve, portanto, para fixar e concentrar CO_2 na forma de malato. A liberação de CO_2 do malato nas células da bainha vascular gera uma concentração local suficientemente alta de CO_2 para que a rubisco funcione perto de sua velocidade máxima e para a supressão da atividade de oxigenase da enzima.

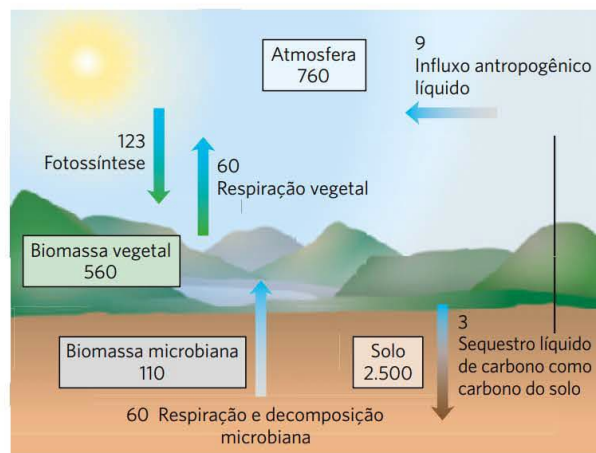


FIGURA Q-2 O ciclo de carbono terrestre. Estoques de carbono (quadros) são mostrados como gigatoneladas (GT), e os fluxos (setas) são mostrados em GT por ano. A biomassa animal é desprezível aqui – menos do que 0,5 GT. [Fonte: informação obtida de C. Jansson et al., *BioScience* 60:683, 2010, Fig. 1.]

deve resultar em um decréscimo correspondente no uso de combustíveis fósseis.

Finalmente, a engenharia de culturas alimentícias visando produzir mais alimento por hectare de terra, ou por hora de trabalho, poderia melhorar a nutrição humana em todo o mundo.

Em princípio, essas metas podem ser alcançadas desenvolvendo-se uma rubisco que não catalisasse também a reação desperdiçadora com o O₂, ou aumentando-se o número de renovação para a rubisco, ou aumentando-se o nível da rubisco e de outras enzimas na via de fixação do carbono. A rubisco, conforme já dito, é uma enzima de ineficiência incomum, com um número de renovação de 3 s⁻¹ a 25°C; a maioria das enzimas tem números de renovação que são ordens de magnitude maiores. Além disso, ela catalisa a reação desperdiçadora com o oxigênio, a qual reduz ainda mais sua eficiência em fixar CO₂ e pro-

duzir biomassa. Se a rubisco pudesse ser geneticamente modificada para aumentar seu número de renovação ou para ser mais seletiva para o CO₂ em relação ao O₂, o efeito seria de maior produção fotossintética de biomassa e, portanto, maior sequestro de CO₂, produção de mais combustível não fóssil e melhor nutrição?

Foi observado, no Capítulo 15, que a visão tradicional de vias metabólicas sustentava que uma etapa em qualquer via era a mais lenta e, portanto, o fator limitante no fluxo de material através da via. Contudo, esforços enormes no sentido de gerar por engenharia genética células ou organismos capazes de produzir mais de uma enzima “limitante” em uma determinada via com frequência levaram a resultados desencorajadores; os organismos normalmente mostravam pouca ou nenhuma alteração no fluxo por aquela via. O ciclo de Calvin é um caso elucidativo nesse ponto. Aumentar a quantidade de rubisco em células vegetais por meio de engenharia genética tem pouco ou nenhum efeito na taxa de conversão de CO₂ em carboidrato. De forma semelhante, mudanças nos níveis de enzimas conhecidas por serem reguladas pela luz e, portanto, suspeitas de desempenharem papéis centrais na regulação da via de assimilação de CO₂ (frutose-1,6-bisfosfatase, 3-fosfoglicerato-cinase e gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase) também levaram a pouco ou nenhum aumento significativo na taxa fotossintética. Todavia, níveis alterados de sedoheptulose-1,7-bisfosfatase, não considerada uma enzima regulatória, têm um impacto significativo na fotossíntese. A análise do controle metabólico (Seção 15.2) sugere que esse resultado não é inesperado; no organismo vivo, as vias podem ser limitadas em mais de uma etapa, uma vez que toda mudança em uma etapa resulta em mudanças compensatórias em outras etapas. Uma determinação cuidadosa do coeficiente de controle de fluxo (ver Quadro 15-1) ajuda a apontar quais as enzimas em uma via devem ser o alvo da engenharia genética. Claramente, engenheiros genéticos e analistas de controle metabólico precisarão trabalhar juntos em problemas como este.

Uma vez que o CO₂ é fixado no 3-fosfoglicerato nas células da bainha vascular, as outras reações do ciclo de Calvin acontecem exatamente da maneira já descrita. Assim, nas plantas C₄, as células do mesófilo realizam a assimilação de CO₂ pela via C₄, e as células da bainha vascular sintetizam amido e sacarose pela via C₃.

Três enzimas da via C₄ são reguladas pela luz, tornando-se mais ativas durante o dia. A malato-desidrogenase é ativada pelo mecanismo de redução dependente de tioredoxina, mostrado na Figura 20-46; a PEP-carboxilase é ativada pela fosforilação de um resíduo de Ser; e a piruvato-fosfato-dicinas é ativada por desfosforilação. Nos últimos

dois casos, os detalhes de como a luz afeta a fosforilação ou a desfosforilação não são conhecidos.

A via de assimilação de CO₂ tem um custo energético maior em plantas C₄ do que em plantas C₃. Para cada molécula de CO₂ assimilada na via C₄, uma molécula de PEP precisa ser regenerada à custa de duas ligações fosfoanidrido do ATP. Assim, as plantas C₄ precisam de cinco moléculas de ATP para assimilar uma molécula de CO₂, ao passo que as plantas C₃ precisam de apenas três (nove por triose-fosfato). À medida que a temperatura aumenta (e a afinidade da rubisco pelo CO₂ diminui, como observado anteriormente), é atingido um ponto (em cerca de 28 a 30°C) no qual o ga-

nho em eficiência oriundo da eliminação da fotorrespiração mais do que compensa este custo energético. As plantas C_4 (p. ex., o capim-colchão) superam o crescimento da maioria das plantas C_3 durante o verão, como qualquer jardineiro experiente pode atestar.

Em plantas CAM, a captura de CO_2 e a ação da rubisco estão separadas temporalmente

Plantas suculentas como os cactos e o abacaxi, nativas de ambientes muito quentes e muito secos, têm outra variação da fixação fotossintética de CO_2 , a qual reduz a perda de vapor de água através dos poros (estômatos) por onde o CO_2 e o O_2 precisam ingressar no tecido vegetal. Em vez de separarem no espaço o aprisionamento inicial do CO_2 e sua fixação pela rubisco (como fazem as plantas C_4), elas separam esses dois eventos ao longo do tempo. À noite, quando o ar está mais fresco e mais úmido, os estômatos abrem-se para permitir a entrada de CO_2 , que é então fixado na forma de oxalacetato pela PEP-carboxilase. O oxalacetato é reduzido a malato e armazenado em vacúolos para proteger as enzimas citosólicas e os plastídeos do pH baixo produzido pela dissociação do ácido málico. Durante o dia, os estômatos fecham-se, impedindo a perda de água que resultaria das altas temperaturas diurnas, e o CO_2 aprisionado ao longo da noite no malato é liberado como CO_2 pela enzima málica ligada ao NADP. Esse CO_2 é agora assimilado pela ação da rubisco e das enzimas do ciclo de Calvin. Como esse método de fixação de CO_2 foi inicialmente descoberto em plantas do tipo suculentas, plantas perenes da família *Crassulaceae*, ele é chamado de metabolismo ácido das crassuláceas (do inglês, *crassulacean acid metabolism*) e as plantas são chamadas de **plantas CAM**.

RESUMO 20.6 Fotorrespiração e as vias C_4 e CAM

- Quando a rubisco usa o O_2 em vez do CO_2 como substrato, o 2-fosfoglicolato então formado é desviado para uma via dependente de oxigênio. O resultado é o consumo aumentado de O_2 – fotorrespiração ou, mais precisamente, o ciclo oxidativo fotossintético do carbono ou ciclo C_2 . O 2-fosfoglicolato é convertido em glioxilato, a seguir em glicina e então em serina, em uma via que envolve enzimas no estroma do cloroplasto, no peroxissomo e na mitocôndria.
- Em plantas C_4 , a via de assimilação de carbono minimiza a fotorrespiração: o CO_2 é primeiro fixado nas células do mesófilo em um composto de quatro carbonos, que passa para as células da bainha vascular e libera CO_2 em altas concentrações. O CO_2 liberado é fixado pela rubisco, e as demais reações do ciclo de Calvin ocorrem como nas plantas C_3 .
- Em plantas CAM, o CO_2 é fixado em malato no escuro e estocado nos vacúolos até o período diurno, quando os estômatos estão fechados (minimizando a perda de água) e o malato serve como fonte de CO_2 para a rubisco.

20.7 Biossíntese de amido, sacarose e celulose

Durante a fotossíntese ativa sob luz intensa, a folha de um vegetal produz mais carboidratos (na forma de trioses-fos-

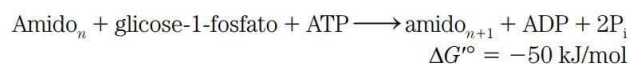
fato) do que precisa para gerar energia ou sintetizar precursores. O excesso é convertido em sacarose e transportado a outras partes da planta para ser utilizado como combustível ou armazenado. Na maioria das plantas, o amido é a principal forma de estocagem, porém em algumas poucas plantas, como a beterraba açucareira e a cana-de-açúcar, a sacarose é a principal forma de estocagem. As sínteses de sacarose e de amido ocorrem em diferentes compartimentos celulares (citossol e plastídeos, respectivamente), e esses processos estão coordenados por uma variedade de mecanismos de regulação, que respondem a mudanças no nível de luminosidade e na velocidade da fotossíntese. A síntese de sacarose e de amido é importante para a planta, mas também para seres humanos: o amido fornece mais do que 80% das calorias da dieta humana em todo o mundo.

A ADP-glicose é o substrato para a síntese de amido em plastídeos vegetais e para a síntese de glicogênio em bactérias

O amido, assim como o glicogênio, é um polímero de alto peso molecular de D-glicose em ligação ($\alpha 1 \rightarrow 4$). Esse composto é sintetizado nos cloroplastos para armazenamento temporário como um dos produtos finais estáveis da fotossíntese; para o armazenamento de longo prazo, ele é sintetizado nos amiloplastos das partes não fotossintéticas das plantas: sementes, raízes e tubérculos (caules subterrâneos).

O mecanismo de ativação da glicose na síntese do amido é semelhante àquela da síntese do glicogênio. Um **açúcar-nucleotídeo** ativado, neste caso a **ADP-glicose**, é formado pela condensação de glicose-1-fosfato com ATP em uma reação essencialmente irreversível pela presença de pirofosfatase inorgânica nos plastídeos (Figura 15-31). A **amido-sintase**, então, transfere resíduos de glicose da ADP-glicose para moléculas preexistentes de amido. As unidades monoméricas são quase certamente adicionadas à extremidade não redutora do polímero em crescimento, como ocorre na síntese de glicogênio (ver Figura 15-32).

A amilose do amido não é ramificada, mas a amilopectina tem numerosas ramificações formadas por ligações ($\alpha 1 \rightarrow 6$) (ver Figura 7-13). Os cloroplastos contêm uma enzima ramificadora, semelhante à enzima de ramificação do glicogênio (ver Figura 15-33), que introduz as ramificações ($\alpha 1 \rightarrow 6$) da amilopectina. Levando em consideração a hidrólise pela pirofosfatase inorgânica do PP_i produzido durante a síntese de ADP-glicose, a reação global para a formação do amido a partir da glicose-1-fosfato é



A síntese de amido é regulada no nível da formação da ADP-glicose, conforme discutido a seguir.

Muitos tipos de bactérias armazenam carboidratos na forma de glicogênio (essencialmente, amido altamente ramificado), sintetizado em uma reação análoga àquela catalisada pela glicogênio-sintase em animais. As bactérias, como os plastídeos vegetais, usam ADP-glicose como a forma ativada de glicose, ao passo que as células animais usam UDP-glicose. Novamente, a semelhança entre o metabolismo dos plastídeos e das bactérias é consistente com a hipótese endossimbiótica para a origem dessas organelas (ver Figura 1-40).

A UDP-glicose é o substrato para a síntese de sacarose no citosol de células das folhas

A maior parte das trioses-fosfato geradas pela fixação do CO_2 em plantas é convertida em sacarose (**Figura 20-51**) ou amido. No curso da evolução, a sacarose deve ter sido selecionada como a forma de transporte de carbono, devido à sua ligação pouco comum entre o C-1 anômero da glicose e o C-2 anômero da frutose. Essa ligação não é hidrolisada por amilases ou por outras enzimas comuns que hidrolisam carboidratos, e a indisponibilidade de carbonos anômeros impede a sacarose de reagir de modo não enzimático (como faz a glicose) com aminoácidos e proteínas.

A sacarose é sintetizada no citosol, a partir da di-hidroxiacetona-fosfato e do gliceraldeído-3-fosfato exportados do cloroplasto. Depois da condensação de duas trioses-fosfato para formar frutose-1,6-bisfosfato (catalisada pela aldolase), a hidrólise pela frutose-1,6-bisfosfatase gera frutose-6-fosfato. A **sacarose-6-fosfato-sintase** catalisa, então, a reação da frutose-6-fosfato com a **UDP-glicose** para formar **sacarose-6-fosfato** (Figura 20-51). Por fim, a **sacarose-6-fosfato-fosfatase** remove o grupo fosfato, tornando a sacarose disponível para a exportação a outros tecidos.

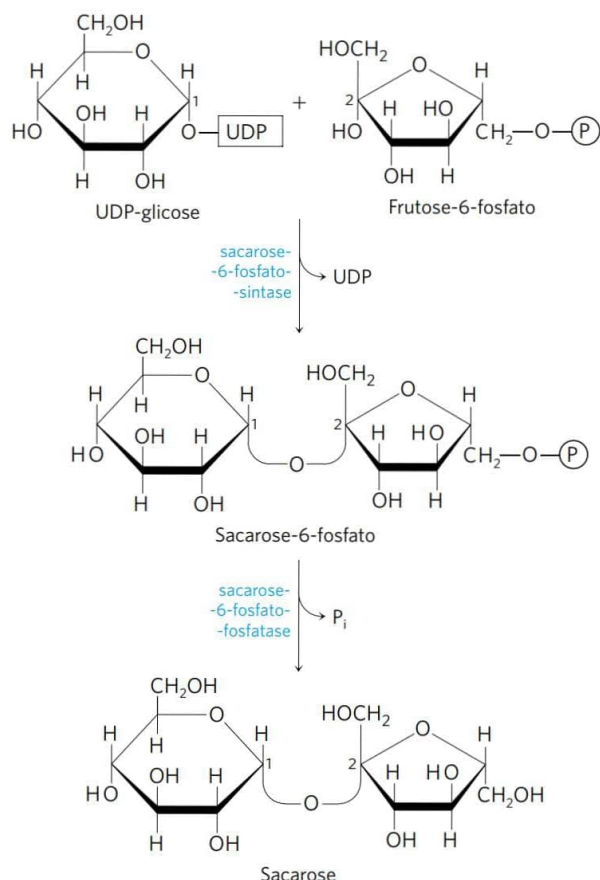


FIGURA 20-51 Síntese da sacarose. A sacarose é sintetizada a partir da UDP-glicose e da frutose-6-fosfato, sintetizadas a partir das trioses-fosfato no citosol da célula vegetal por vias mostradas nas Figuras 15-31 e 20-36. A sacarose-6-fosfato-sintase da maioria das espécies vegetais é regulada alostericamente por glicose-6-fosfato e P_i .

A reação catalisada pela sacarose-6-fosfato-sintase é um processo de baixa energia ($\Delta G^\circ = -5,7 \text{ kJ/mol}$), mas a hidrólise da sacarose-6-fosfato a sacarose é suficientemente exergônica ($\Delta G^\circ = -16,5 \text{ kJ/mol}$) para tornar a síntese global da sacarose essencialmente irreversível. A síntese de sacarose é regulada e intimamente coordenada com a síntese de amido, conforme será visto.

Uma diferença marcante entre as células vegetais e animais é a ausência no citosol da célula vegetal da enzima pirofosfatase inorgânica, que catalisa a reação



Para muitas reações biossintéticas que liberam PP_i , a atividade da pirofosfatase torna o processo mais favorável energeticamente, tendendo a tornar essas reações irreversíveis. Nas plantas, essa enzima está presente nos plastídeos, mas ausente no citosol. Como resultado, o citosol das células foliares contém uma concentração substancial de PP_i – o suficiente ($\sim 0,3 \text{ mM}$) para tornar reações como a catalisada pela UDP-glicose-pirofosforilase (ver Figura 15-31) facilmente reversíveis. Lembre-se, do Capítulo 14 (p. 540), de que a isoenzima citosólica da fosfofrutocinase em plantas usa PP_i , e não ATP, como doador de um grupo fosforila.

A conversão de trioses-fosfato em sacarose e amido é firmemente regulada

As trioses-fosfato produzidas pelo ciclo de Calvin sob luz solar intensa, conforme salientado, podem ser temporariamente estocadas no cloroplasto como amido ou convertidas em sacarose e exportadas para partes não fotossintéticas das plantas, ou ambos. O balanço entre os dois processos é fortemente regulado e ambos precisam ser coordenados com a velocidade de fixação de carbono. Cinco sextos das trioses-fosfato formadas no ciclo de Calvin precisam ser reciclados, regenerando ribulose-1,5-bisfosfato (Figura 20-41). Se mais de um sexto das trioses-fosfato é retirado do ciclo para fazer sacarose e amido, o ciclo terá sua velocidade reduzida ou parará completamente. No entanto, a conversão *insuficiente* de trioses-fosfato em amido ou sacarose aprisionaria fosfato, deixando o cloroplasto deficiente em P_i , o qual é essencial para a operação do ciclo de Calvin.

O fluxo de trioses-fosfato para sacarose é regulado pela atividade da frutose-1,6-bisfosfatase (FBPase-1) e da enzima que efetivamente reverte sua ação, a fosfofrutocinase dependente de PP_i (PP-PFK-1). Portanto, essas enzimas são pontos cruciais na determinação do destino das trioses-fosfato produzidas pela fotossíntese. Ambas as enzimas são reguladas pela **frutose-2,6-bisfosfato (F26BP)**, que inibe a FBPase-1 e estimula a PP-PFK-1. Em plantas vasculares, a concentração de F26BP varia inversamente com a taxa de fotossíntese (**Figura 20-52**). A fosfofrutocinase 2, responsável pela síntese de F26BP, é inibida por di-hidroxiacetona-fosfato ou 3-fosfoglicerato, sendo estimulada por frutose-6-fosfato e P_i . Durante a fotossíntese ativa, a di-hidroxiacetona-fosfato é produzida e P_i é consumido, resultando na inibição da PFK-2 e em concentrações reduzidas de F26BP. Isso favorece um fluxo maior de trioses-fosfato para a formação de frutose-6-fosfato e síntese de sacarose. Com esse sistema de regulação, a sín-

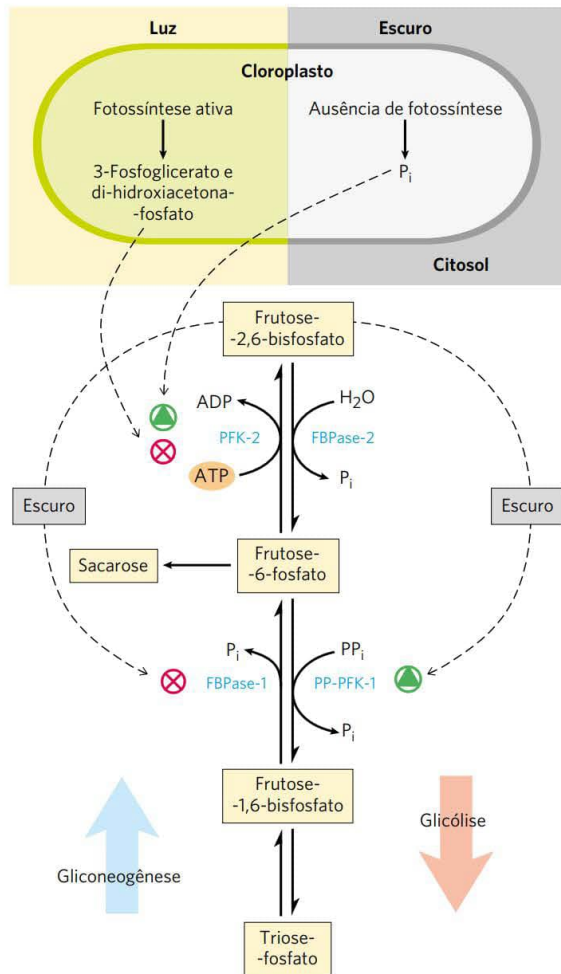


FIGURA 20-52 Frutose-2,6-bisfosfato na regulação da síntese de sacarose. A concentração do efetor alostérico frutose-2,6-bisfosfato em células vegetais é regulada pelos produtos da assimilação fotossintética de carbono e por P_i . Di-hidroxiacetona-fosfato e 3-fosfoglicerato, produzidos pela assimilação de CO_2 , inibem a fosfofrutocinase 2 (PFK-2), a enzima que sintetiza o efetor; o P_i estimula a PFK-2. A concentração de frutose-2,6-bisfosfato é, portanto, inversamente proporcional à velocidade da fotossíntese. No escuro, a concentração de frutose-2,6-bisfosfato aumenta e estimula a enzima glicolítica fosfofrutocinase 1 dependente de PP_i (PP-PFK-1), enquanto inibe a enzima gliconeogênica frutose-1,6-bisfosfatase (FBPase-1). Quando a fotossíntese está ativa (na luz), a concentração do regulador diminui e a síntese de frutose-6-fosfato e de sacarose é favorecida.

tese de sacarose ocorre quando o nível de trioses-fosfato produzido pelo ciclo de Calvin excede aquele necessário para manter a operação do ciclo.

A síntese de sacarose também é regulada no nível da sacarose-6-fosfato-sintase, que é ativada alostericamente por glicose-6-fosfato e inibida por P_i . Essa enzima é ainda regulada por fosforilação e desfosforilação; uma proteína-cinase fosforila a enzima em um resíduo específico de Ser, tornando-a menos ativa, e uma fosfatase reverte esta inativação, removendo o fosfato (Figura 20-53). A inibição da cinase por glicose-6-fosfato e da fosfatase por P_i aumenta

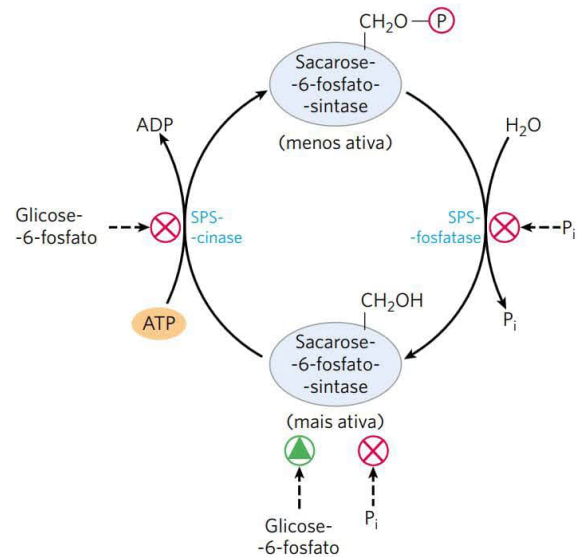


FIGURA 20-53 Regulação da sacarose-fosfato-sintase por fosforilação. Uma proteína-cinase (SPS-cinase) específica para a sacarose fosfato-sintase (SPS) fosforila um resíduo de Ser na SPS, inativando-a; uma fosfatase específica (SPS-fosfatase) reverte esta inibição. A cinase é inibida alostericamente por glicose-6-fosfato, que também ativa a SPS alostericamente. A fosfatase é inibida por P_i , que também inibe a SPS diretamente. Assim, quando a concentração de glicose-6-fosfato é alta como resultado da fotossíntese ativa, a SPS é ativada e produz sacarose-fosfato. Uma alta concentração de P_i , que ocorre quando a conversão fotossintética de ADP em ATP é lenta, inibe a síntese de sacarose-fosfato.

os efeitos desses dois compostos na síntese da sacarose. Quando hexoses-fosfato são abundantes, a sacarose-6-fosfato-sintase é ativada por glicose-6-fosfato; quando P_i está elevado (como ocorre quando a fotossíntese é lenta), a síntese de sacarose é diminuída. Quando a fotossíntese está ativa, trioses-fosfato são convertidas em frutose-6-fosfato, que é rapidamente equilibrada com glicose-6-fosfato pela fosfoexose-isomerase. Como o equilíbrio dessa reação favorece bastante a formação da glicose-6-fosfato, assim que a frutose-6-fosfato se acumula, o nível de glicose-6-fosfato aumenta e a síntese de sacarose é estimulada.

A enzima-chave da regulação da síntese de amido é a **ADP-glicose-pirofosforilase (Figura 20-54)**; ela é ativada por 3-fosfoglicerato (que se acumula durante a fotossíntese ativa) e inibida por P_i (que se acumula quando a condensação de ADP e P_i promovida pela luz é reduzida). Quando a síntese de sacarose diminui, o 3-fosfoglicerato formado pela fixação do CO_2 é acumulado, ativando essa enzima e estimulando a síntese de amido.

O ciclo do glioxilato e a gliconeogênese produzem glicose em sementes em germinação

Muitas plantas armazenam lipídeos (óleos) e proteínas em suas sementes para serem usados como fontes de energia e como precursores biossintéticos durante a germinação, antes do desenvolvimento da capacidade fotossintética. Esses componentes armazenados são convertidos em carboidratos pela ação combinada de diversas vias. Aminoácidos

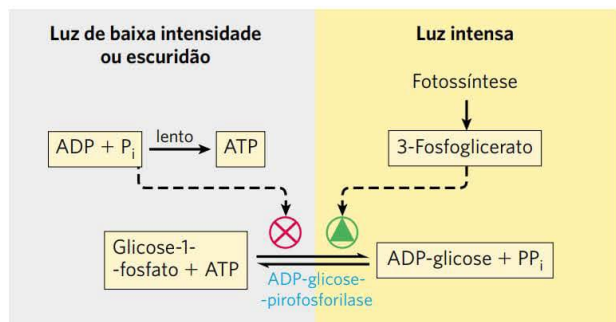
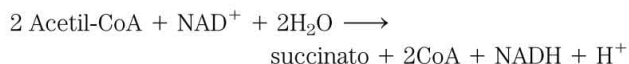


FIGURA 20-54 Regulação da ADP-glicose-fosforilase por 3-fosfoglicerato e P_i . Esta enzima, que produz o precursor para a síntese do amido, é o passo limitante da velocidade de produção do amido. A enzima é estimulada alostericamente por 3-fosfoglicerato (3-PGA) e inibida por P_i ; de fato, a razão $[3\text{-PGA}]/[P_i]$, que se eleva com o aumento na velocidade da fotossíntese, controla a síntese de amido nesta etapa.

dos glicogênicos (ver Tabela 14-4) derivados da quebra de proteínas armazenadas em sementes são transaminados e oxidados a succinil-CoA, piruvato, oxalacetato, fumarato e α -cetoglutarato (Capítulo 18) – todos eles sendo boa matéria-prima para a gliconeogênese. A gliconeogênese ativa em sementes em germinação fornece glicose para a síntese de sacarose, polissacarídeos e muitos outros metabólitos derivados de hexoses. Em mudas de plantas, a sacarose fornece a maior parte da energia química necessária para o crescimento inicial.

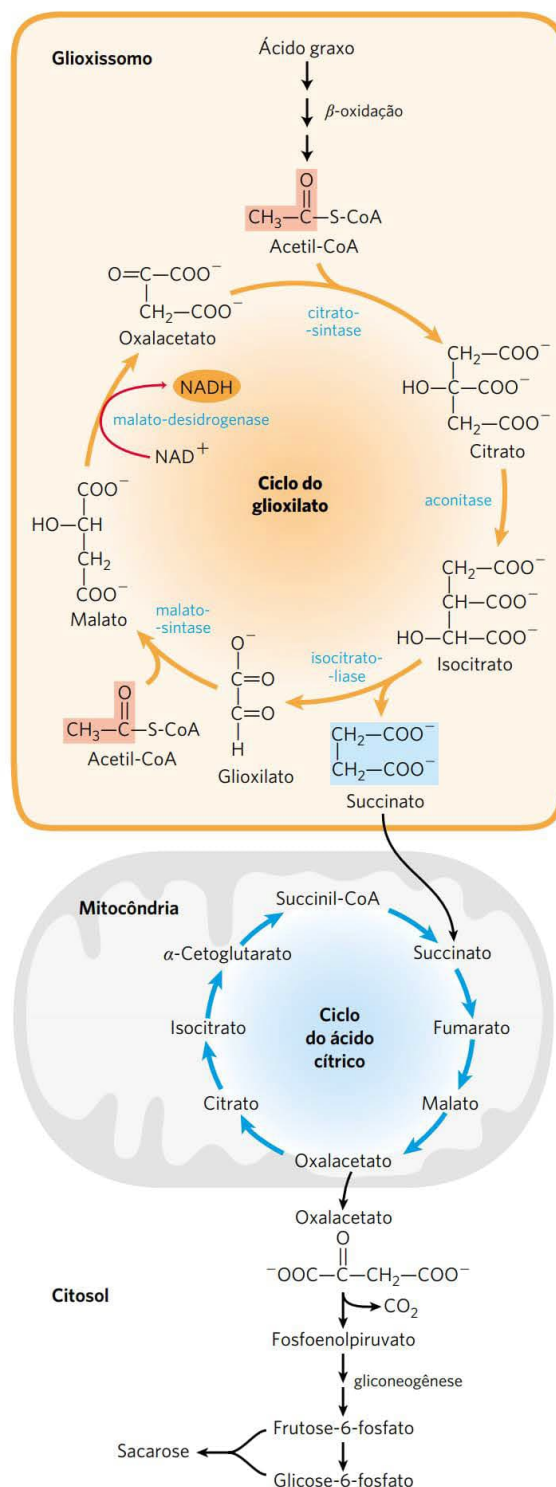
Os triacilgliceróis armazenados nas sementes também fornecem combustível para plantas em germinação. Eles são hidrolisados a ácidos graxos livres, que sofrem β -oxidação a acetil-CoA em peroxissomos especializados, chamados de **glioxissomos**, que se desenvolvem durante a germinação das sementes (ver Figura 17-14). A acetil-CoA formada a partir dos óleos das sementes entra no **ciclo do glioxilato** (Figura 20-55), o que possibilita a conversão líquida de acetato a succinato ou outros intermediários de quatro carbonos do ciclo do ácido cítrico:



No ciclo do glioxilato, a acetil-CoA é condensada com o oxalacetato para formar citrato, e o citrato é convertido a isocitrato, exatamente como no ciclo do ácido cítrico.

FIGURA 20-55 Conversão de ácidos graxos armazenados em sacarose nas sementes em germinação. Essa via inicia em peroxissomos especializados, chamados de glioxissomos. A citrato-sintase, a aconitase e a malato-desidrogenase do ciclo do glioxilato são isoenzimas das enzimas do ciclo do ácido cítrico; isocitrato-liase e malato-sintase são exclusivas do ciclo do glioxilato. Observe que dois grupos acetila (em cor salmão) entram no ciclo e quatro carbonos saem na forma de succinato (em azul). O succinato é produzido e exportado para as mitocôndrias, onde é convertido em oxalacetato por enzimas do ciclo do ácido cítrico. O oxalacetato entra no citosol e serve como matéria-prima para a gliconeogênese e para a síntese de sacarose, a forma de transporte de carbono nas plantas. O ciclo do glioxilato foi elucidado por Hans Kornberg e Neil Madsen no laboratório de Hans Krebs.

A próxima etapa, porém, não é a quebra do isocitrato pela isocitrato-desidrogenase, mas a clivagem do isocitrato pela **isocitrato-liase**, formando succinato e **glioxilato**. O glioxilato, então, é condensado com uma segunda molécula de acetil-CoA para a geração de malato, em uma reação ca-



talisada pela **malato-sintase**. O malato é posteriormente oxidado a oxalacetato, o qual pode ser condensado com outra molécula de acetil-CoA para iniciar outra volta do ciclo. O succinato passa para a matriz mitocondrial, onde é convertido, pelas enzimas do ciclo do ácido cítrico, em oxalacetato. O oxalacetato desloca-se para o citosol e pode ser convertido em fosfoenolpiruvato pela PEP-carboxi-nase, e, então, pela gliconeogênese em frutose-6-fosfato, o precursor da sacarose. Desse modo, seqüências de reações que ocorrem em três compartimentos subcelulares (glio-xissomos, mitocôndrias e citosol) são integradas para a produção de frutose-6-fosfato ou sacarose a partir de lípi-deos armazenados.

As enzimas comuns ao ciclo do ácido cítrico e do glio-xilato têm duas isoenzimas, uma específica das mitocôndrias, outra específica dos glio-xissomos. A separação física entre as enzimas do ciclo do glio-xilato e da β -oxidação e as enzi-mas do ciclo do ácido cítrico mitocondrial impede a oxida-ção adicional da acetil-CoA a CO_2 . Cada volta do ciclo do glio-xilato consome duas moléculas de acetil-CoA e produz uma molécula de succinato, que está, então, disponível aos propósitos biossintéticos. A hidrólise dos triacilgliceróis armazenados também produz glicerol-3-fosfato, que pode entrar na via gliconeogênica depois de sua oxidação a di-hidroxiacetona-fosfato (ver Figura 14-17).

Foi observado anteriormente (Capítulo 14) que as cé-lulas animais podem realizar a gliconeogênese a partir de precursores de três e quatro carbonos, mas não a partir dos dois carbonos que formam a acetila da acetil-CoA. Uma vez que a reação da piruvato-desidrogenase é efetivamente irreversível (ver Seção 16.1) e os animais não têm as en-zimas específicas para o ciclo do glio-xilato (isocitrato-liase e malato-sintase), eles não têm como converter acetil-CoA a piruvato ou oxalacetato. Assim, ao contrário das plantas vasculares, os animais não podem realizar síntese líquida de glicose a partir de lipídeos.

A celulose é sintetizada por estruturas supramoleculares na membrana plasmática

A celulose é um importante constituinte das paredes ce-lulares das plantas, proporcionando resistência e rigidez e impedindo o inchamento celular e a ruptura da membrana plasmática, que podem ocorrer quando as condições osmóticas favorecem a entrada de água na célula. A cada ano, mundialmente, as plantas sintetizam mais de 10^{11} tonela-das de celulose, fazendo desse polímero simples um dos compostos mais abundantes da biosfera. A estrutura da celulose na parede da célula vegetal é simples: polímeros lineares de milhares de resíduos de D-glicose unidos por li-gações ($\beta 1 \rightarrow 4$), que se reúnem em feixes de pelo menos 18 cadeias, os quais cocristalizam para formar microfibrilas, que, por sua vez, podem se reunir em macrofibrilas maiores. (Figura 20-56).

Como componente principal da parede celular vegetal, a celulose precisa ser sintetizada a partir de precursores intracelulares, mas suas cadeias devem ser depositadas e agrupadas fora da membrana plasmática. A maquinaria en-zimática para a iniciação, o alongamento e a exportação das cadeias de celulose é, assim, mais complicada do que aquela necessária para sintetizar amido ou glicogênio (que não são exportados).

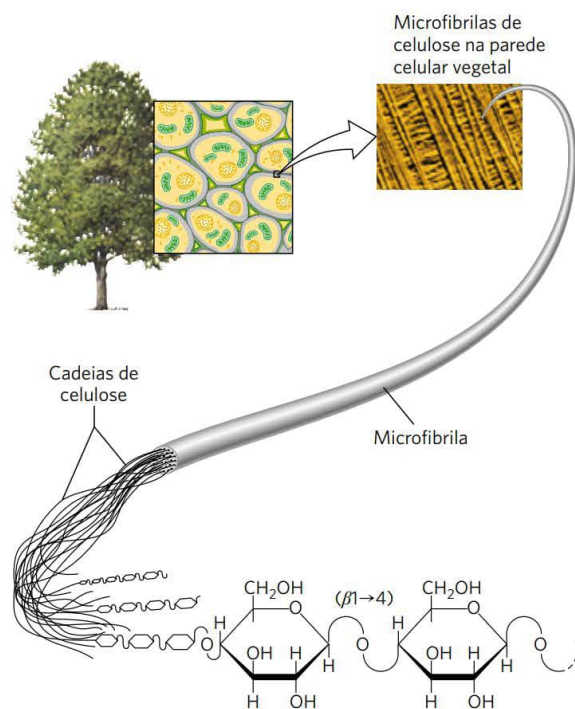


FIGURA 20-56 Estrutura da celulose. A parede celular vegetal é formada, em parte, por moléculas de celulose, arranjadas lado a lado para formar estruturas cristalinas – microfibrilas de celulose. Muitas microfibrilas se combinam para formar macrofibrilas maiores de celulose. As macrofibrilas podem ser visualizadas por microscopia eletrônica de varredura como estruturas de 5 a 12 nm de diâmetro, depositada na superfície celular em diversas camadas distinguíveis pelas diferentes orienta-ções das fibrilas. [Fonte: micrografia eletrônica de Biophoto Associates/Science Source.]

A complexa maquinaria enzimática que monta as ca-deias de celulose atravessa a membrana plasmática, com uma parte posicionada no citosol para ligar o substrato, a UDP-glicose e alongar as cadeias, e outra parte se estenden-do para fora, responsável pela exportação das moléculas de celulose para o espaço extracelular. A microscopia eletrô-nica de criofatura mostra um complexo sintetizador de ce-lulose, também chamado de **roseta**, composto de seis par-tículas grandes, arranjadas em um hexágono regular com um diâmetro de cerca de 30 nm (Figura 20-57a). Diversas proteínas, incluindo a subunidade catalítica da **celulose-sintase**, constituem essa estrutura. A maior parte do pro-gresso recente no entendimento da síntese de celulose advém de estudos genéticos e genético-moleculares da planta *Arabidopsis thaliana*; essa pequena planta que produz flores é especialmente apropriada à dissecação genética e seu genoma foi sequenciado. A estrutura da celulose-sinta-se dos vegetais é similar àquela da bactéria *Rhodobacter sphaeroides*, que foi determinada por cristalografia por raios X (Figura 20-57b).

Em um modelo de trabalho para a síntese da celulose, cadeias de celulose têm sua síntese iniciada pela transfe-rência de um resíduo de glicose da UDP-glicose para um resíduo de glicose já ligado à celulose-sintase, que funcio-na como “fragmento iniciador”, no lado citoplasmático da membrana plasmática, formando um dissacarídeo. À medi-

Rosetas visualizadas por microscopia eletrônica de criofatura da membrana plasmática da célula vegetal. Cada uma das seis unidades da roseta é um complexo da celulose-sintase.

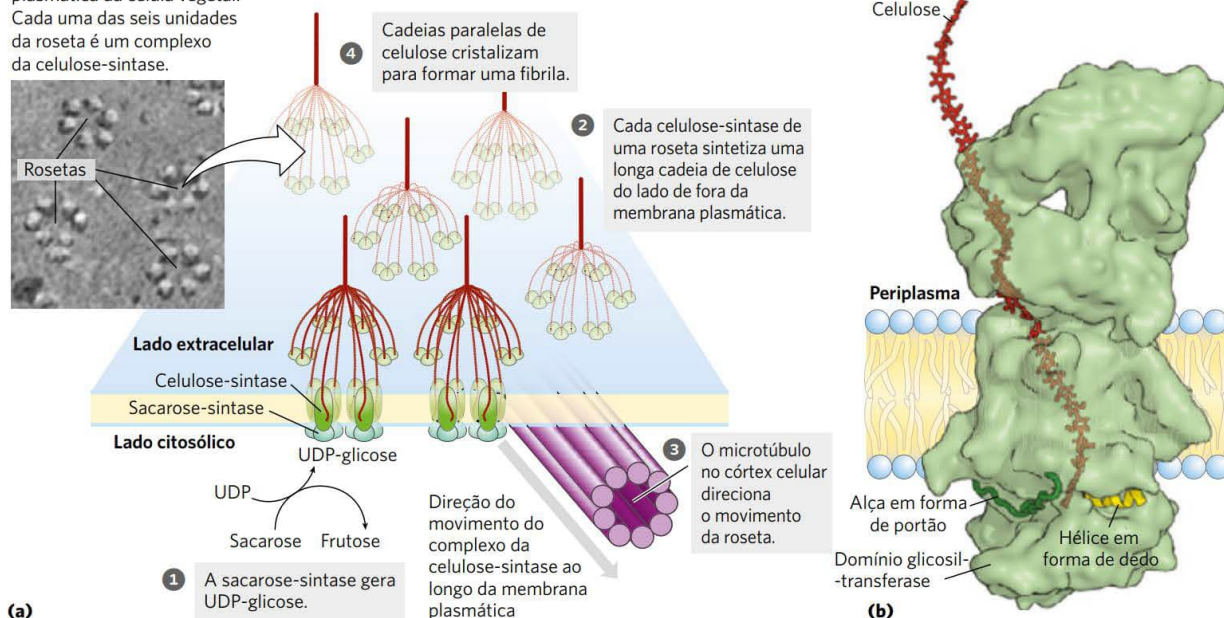
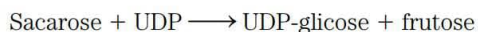


FIGURA 20-57 Um modelo para a síntese de celulose. (a) Este esquema é derivado de uma combinação de estudos genéticos e bioquímicos da *Arabidopsis thaliana* e de outras plantas vasculares. (b) A estrutura da celulose-sintase da bactéria *Rhodobacter sphaeroides*. A parte transmembrana da proteína forma um canal através do qual o polímero de celulose que está sendo alongado (em vermelho) é empurrado para o periplasma à medida que a cadeia cresce pela adição de unidades de glicose na superfície interna da membrana plasmática. Duas estruturas da enzima movem-se durante o ciclo catalítico. A alça que forma um portão se move para o sítio de ligação do substrato quando a UDP-glicose se liga, e, após, move-se para fora para permitir que o UDP saia do sítio ativo. A hélice em forma de dedo toca o resíduo de glicose na extremidade crescente do polímero, e, então, após a adição de um novo resíduo, move-se de maneira a tocar esse novo resíduo terminal. O domínio glicosil-transferase estende-se para o citoplasma, onde liga seu substrato, a UDP-glicose. [Fontes: (a) micrografia eletrônica © cortesia da Dra. Candace H. Haigler, North Carolina State University e do Dr. Mark Grimson, Texas Tech University. (b) PDB ID 5EJZ, J. L. W. Morgan et al., *Nature* 531:329, 2016. Uma extensão da cadeia de celulose foi modelada.]

da que a adição de outros resíduos de glicose aumenta a cadeia, ela sofre uma extrusão através de um canal formado pelas hélices transmembrana da celulose-sintase e, na superfície externa da membrana plasmática, une-se a cadeias em crescimento produzidas por moléculas vizinhas de celulose-sintase, a fim de formar uma microfibrila de celulose. Os polímeros de mais de 6 a 8 unidades de glicose são insolúveis em água, promovendo a cristalização das microfibrilas. Não há um comprimento pré-definido para um polímero de celulose; a síntese segue em frente, e alguns polímeros podem ter 15 mil resíduos de glicose.

A UDP-glicose usada para a síntese de celulose (etapa 1 na Figura 20-57) é gerada a partir da sacarose produzida durante a fotossíntese, em uma reação catalisada pela sacarose-sintase (assim denominada devido à reação reversa):



Uma forma de sacarose-sintase ligada à membrana pode produzir uma concentração local alta de UDP-glicose para a síntese de celulose.

Cada uma das seis partículas da roseta contém, provavelmente, três moléculas de celulose-sintase, cada uma delas sintetizando uma única cadeia de celulose (etapa 2). O grande complexo enzimático que catalisa esse processo se move ao longo da membrana plasmática em um senti-

do frequentemente relacionado ao curso dos microtúbulos no córtex celular, a camada citoplasmática logo abaixo da membrana (etapa 3). Quando esses microtúbulos fazem perpendiculares ao eixo de crescimento da planta, as microfibrilas de celulose são depositadas de modo similar, a fim de promover o alongamento. Pensa-se que o movimento dos complexos de celulose-sintase seja promovido pela energia liberada na reação de polimerização e não por um motor molecular, como a kinesina.

Acredita-se que a microfibrila fundamental de celulose produzida por um complexo de síntese de celulose do tipo roseta seja composta de 18 cadeias depositadas lado a lado com a mesma orientação (paralela) com relação às extremidades redutora e não redutora. Os 18 polímeros separados coalescem sobre a superfície externa da célula e cristalizam logo após a polimerização (etapa 4), imediatamente antes de serem integrados na parede celular.

Na UDP-glicose, a glicose é ligada ao nucleotídeo por uma ligação α , mas na celulose, os resíduos de glicose estão unidos por ligações ($\beta 1 \rightarrow 4$), de modo que há uma inversão da configuração no carbono anômico (C-1) na medida em que as ligações glicosídicas se formam. Imagina-se que as glicosil-transferases que invertem a configuração usam um mecanismo de deslocamento único, com ataque nucleofílico pela espécie aceptora no carbono anômico do açúcar doador (neste caso, UDP-glicose).

RESUMO 20.7 Biossíntese de amido, sacarose e celulose

- A amido-sintase nos cloroplastos e amiloplastos catalisa a adição de resíduos individuais de glicose, doados por ADP-glicose, à cadeia do polímero em crescimento, provavelmente à extremidade não redutora. As ramificações na amilopectina são introduzidas por uma segunda enzima.
- A sacarose é sintetizada no citosol em duas etapas, a partir de UDP-glicose e frutose-1-fosfato.
- A partição das trioses-fosfato entre a síntese de sacarose e a síntese de amido é regulada pela frutose-2,6-bis-fosfato (F26BP), um efetor alostérico das enzimas que determinam o nível de frutose-6-fosfato. A concentração de F26BP varia inversamente com a velocidade da fotossíntese, e a F26BP inibe a síntese de frutose-6-fosfato, o precursor da sacarose.
- O ciclo do glioxilato, que ocorre nos glioxissomos das sementes em germinação de algumas plantas, utiliza diversas enzimas do ciclo do ácido cítrico e duas enzimas adicionais: isocitrato-liase e malato-sintase. O desvio das duas etapas de descarboxilação do ciclo do ácido cítrico torna possível a formação *líquida* de succinato, oxalacetato e outros intermediários do ciclo do ácido cítrico a partir de acetil-CoA. O oxalacetato formado desse modo pode ser utilizado para a síntese de glicose (e, por fim, de sacarose) via gliconeogênese.
- Nas células de plantas, a síntese de celulose ocorre em complexos de síntese de celulose do tipo roseta na membrana plasmática, os quais contêm múltiplas cópias da celulose-sintase. Essa enzima tem uma atividade glicosil-transferase em seu domínio citoplasmático e forma um canal transmembrana através do qual a cadeia de celulose em crescimento sofre extrusão da célula. As unidades de glicose são transferidas para a extremidade não redutora da cadeia em crescimento a partir da UDP-glicose. Cada roseta produz simultaneamente e em paralelo 18 cadeias separadas. As cadeias cristalizam em microfibrilas que se integram à parede celular. Os microtúbulos corticais orientam as microfibrilas em desenvolvimento.

20.8 Integração do metabolismo de carboidratos em plantas

O metabolismo de carboidratos em uma célula vegetal típica é, em muitos aspectos, mais complexo do que em uma célula animal típica. A célula vegetal realiza os mesmos processos que geram energia em células animais (glicólise, ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa); ela pode gerar hexoses a partir de compostos de três e quatro carbonos pela gliconeogênese; pode oxidar hexoses-fosfato a pentoses-fosfato com a geração de NADPH (a via oxidativa das pentoses-fosfato); e pode produzir um polímero de resíduos de glicose com ligações ($\alpha 1 \rightarrow 4$) (amido) e degradá-lo para gerar hexoses. No entanto, além dessas transformações dos carboidratos que ela partilha com a célula animal, a célula vegetal fotossintética pode fixar CO_2 em compostos orgânicos (a reação da rubisco); usar os produtos da fixação para gerar trioses, hexoses e pentoses (o ciclo de Calvin); e converter a acetil-CoA gerada pela quebra de ácidos graxos em compostos de quatro carbonos (o ciclo do glioxilato) e os compostos de quatro carbonos em hexoses (gliconeogênese). Esses processos exclusivos da célula vegetal são segregados em vários compartimentos celulares não encontrados em células animais: o ciclo do glioxilato em glioxissomos, o ciclo de Calvin nos cloroplastos, a síntese de amido nos amiloplastos e o armazenamento de ácidos orgânicos nos vacúolos. A integração dos eventos entre esses vários compartimentos requer transportadores específicos nas membranas de cada organela para mover produtos de uma organela a outra ou para o citosol.

Conjuntos (*pools*) de intermediários em comum conectam vias em diferentes organelas

Embora a descrição das transformações metabólicas em células vegetais tenha sido feita em termos de vias individuais, essas vias se interconectam de forma tão completa que se deve considerar os conjuntos (*pools*) de intermediários metabólicos partilhados por essas vias e conectados por reações prontamente reversíveis (**Figura 20-58**). Um desses **conjuntos de metabólitos** inclui as hexoses-fosfato glicose-1-fosfato, glicose-6-fosfato e frutose-6-fosfato; um

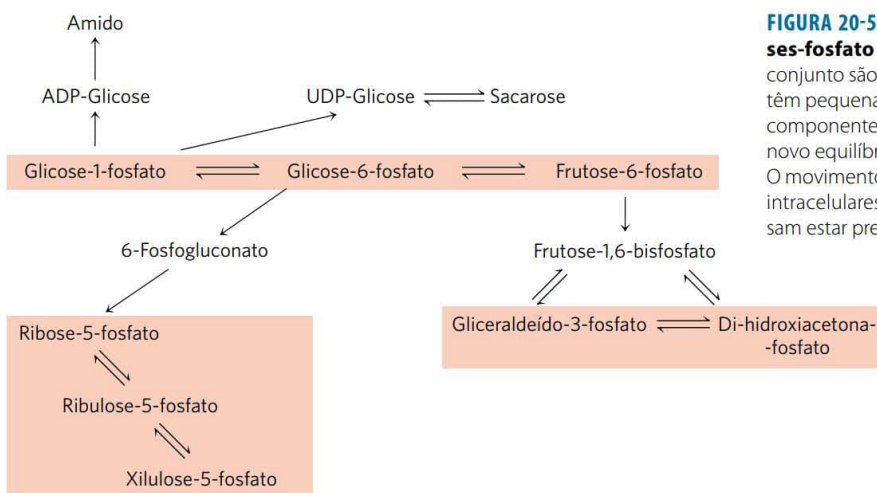


FIGURA 20-58 Conjuntos de hexoses-fosfato, pentoses-fosfato e trioses-fosfato. Os compostos em cada conjunto são prontamente interconvertíveis por reações que têm pequenas variações de energia livre padrão. Quando um componente do conjunto é temporariamente esgotado, um novo equilíbrio é rapidamente estabelecido a fim de repô-lo. O movimento dos açúcares-fosfato entre os compartimentos intracelulares é limitado; transportadores específicos precisam estar presentes em uma membrana de organela.

segundo inclui as pentoses-5-fosfato: ribose-5-fosfato, ribulose-5-fosfato e xilulose-5-fosfato; um terceiro inclui as trioses-fosfato di-hidroxiacetona-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato. Os fluxos de metabólitos por esses conjuntos mudam em magnitude e sentido em resposta a mudanças nas condições das plantas, variando com o tipo de tecido. Os transportadores nas membranas de cada organela movem compostos específicos para dentro e para fora, e a regulação desses transportadores presumivelmente influencia o grau com o qual os conjuntos se misturam.

Durante as horas de luz, as trioses-fosfato produzidas no tecido foliar fotossintético (tecidos “fonte” ou produ-

tores) pelo ciclo de Calvin saem do cloroplasto para o conjunto citosólico de hexoses-fosfato, onde são convertidas em sacarose para transporte a tecidos não fotossintéticos (tecidos “dreno” ou drenadores) (**Figura 20-59**). Em tecidos dreno, como raízes, tubérculos e bulbos, a sacarose é convertida em amido para armazenamento, ou usada como fonte de energia, via glicólise. Em plantas em crescimento, as hexoses-fosfato também são retiradas do conjunto para a síntese de paredes celulares. À noite, o amido é metabolizado pela glicólise e pela fosforilação oxidativa para fornecer energia para ambos os tecidos, “fontes” e “drenos”.

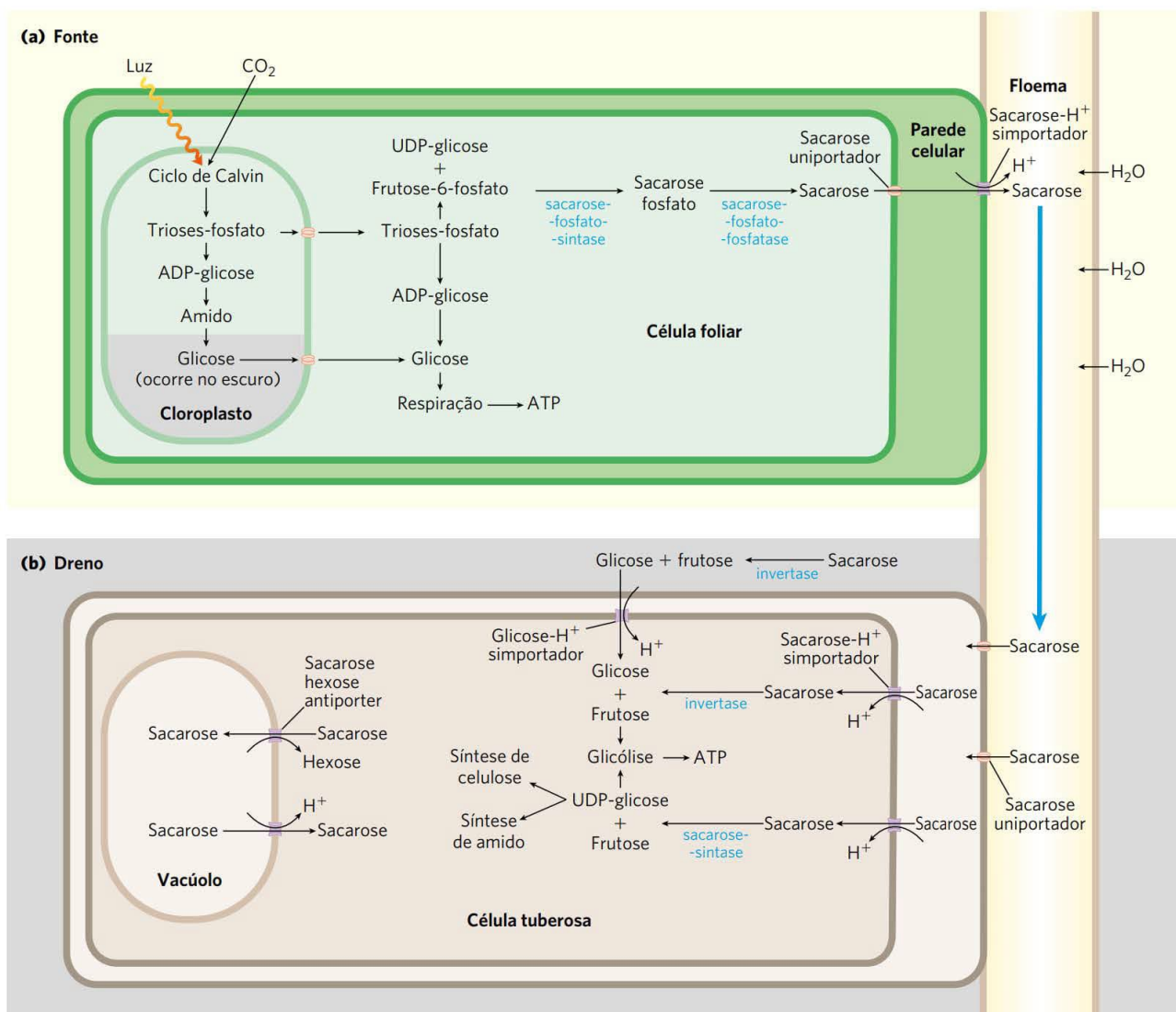


FIGURA 20-59 Movimento da sacarose entre tecidos “fontes” e “drenos”. (a) Durante as horas de luz, folhas fotossintéticas (tecidos “fonte”) fixam CO₂ em trioses-fosfato nos cloroplastos, via ciclo de Calvin. Parte dessas trioses-fosfato é utilizada nos cloroplastos para sintetizar amido; o restante é exportado para o citosol, onde podem ser convertidas em frutose-6-fosfato e glicose-1-fosfato, via gliconeogênese. A sacarose, sintetizada a partir de UDP-glicose e frutose, é exportada das células do mesófilo da folha para o floema da planta; o alto conteúdo de sacarose no floema, resultante dessa passagem, causa o movimento de água para o floema, por osmose. O aumento resultante na pressão (turgor; p. 57) empurra a solução no floema (seiva) em direção aos tecidos “dreno” (bulbos, tubérculos, raízes). (b) A sacarose move-se do floema para os tecidos drenadores, onde ela é convertida em amido ou em celulose para a parede celular, ou é usada como combustível para a glicólise, o ciclo do ácido cítrico e a fosforilação oxidativa, fornecendo ATP para esses tecidos não fotossintéticos. O transporte de açúcar através da membrana plasmática e entre compartimentos intracelulares é possibilitado por diversos simportadores e antiportadores acoplados a um gradiente de prótons.

RESUMO 20.8 Integração do metabolismo de carboidratos em plantas

- As vias individuais do metabolismo de carboidratos em plantas se sobrepõem intensamente; elas partilham conjuntos de intermediários comuns, incluindo hexoses-fosfato, pentoses-fosfato e trioses-fosfato. Os transportadores nas membranas dos cloroplastos, das mitocôndrias e dos amiloplastos medeiam o movimento de açúcares-fosfato entre as organelas. O sentido do fluxo de metabólitos através desses conjuntos dentro de uma folha muda do dia para a noite.
- A sacarose produzida em um tecido fotossintético (fonte) é exportada a tecidos não fotossintéticos (drenadores), como raízes e tubérculos, via floema da planta.

Termos-chave

Termos em negrito estão definidos no glossário.

fotossíntese 755	ferredoxina:
reações	NAD ⁺ -redutase 766
foto dependentes 755	fotossistema II (PSII) 766
reações de assimilação de carbono 755	fotossistema I (PSI) 766
reação de fixação de carbono 755	plastocianina 766
foto fosforilação 756	fotossíntese
cloroplasto 756	oxigênica 766
estroma 756	esquema Z 767
tilacoides 756	plastoquinona (PQ) 768
lamelas 756	fluxo acíclico de elétrons 771
plastídeo 757	fluxo cíclico de elétrons 771
amiloplasto 757	fotofosforilação
reação de Hill 757	cíclica 771
fóton 758	transições de estado 771
quantum 759	complexo de liberação de oxigênio 773
estado excitado 759	complexo de quebra da água 773
estado basal 759	cromatóforo 774
fluorescência 759	bacteriorrodopsina 778
éxciton 759	ciclo de Calvin 780
transferência de éxcitons 759	ribulose-1,5-bisfosfato 780
clorofilas 759	3-fosfoglicerato 780
pigmentos acessórios 759	via das pentoses-fosfato 781
carotenoides 760	ciclo redutor das pentoses-fosfato 781
β -caroteno 760	plantas C ₃ 781
espectro de ação 760	ribulose-1,5-bisfosfato
fotossistema 761	carboxilase/oxigenase (rubisco) 781
centro de reação fotoquímica 761	rubisco-ativase 783
complexos de captação de luz (LHCs) 761	aldolase 784
feofitina 763	transcetolase 784
ferredoxina 766	

sedoeptulose-1,7-bisfosfato 785	plantas CAM 798
ribulose-5-fosfato 785	açúcares-nucleotídeos 798
tiorredoxina 791	ADP-glicose 798
ferredoxina-tiorredoxina-redutase 791	amido-sintase 798
fotorrespiração 792	sacarose-6-fosfato-sintase 799
2-fosfoglicolato 792	UDP-glicose 799
via do glicolato 793	frutose-2,6-bisfosfato 799
ciclo oxidativo fotossintético do carbono (ciclo C ₂) 794	ADP-glicose-pirofosforilase 800
plantas C₄ 794	glioxissomo 801
via C₄ 794	ciclo do glioxilato 801
fosfoenolpiruvato-carboxilase 794	isocitrato-liase 801
enzima málica 795	glioxilato 801
piruvato-fosfato-dicinase 796	malato-sintase 802
	celulose-sintase 802
	conjuntos (<i>pools</i>) de metabólitos 804

Teste seu conhecimento

1. Eficiência fotoquímica da luz em diferentes comprimentos de onda A velocidade da fotossíntese em uma planta verde, medida pela produção de O₂, é maior quando a planta é iluminada com luz de comprimento de onda de 680 nm do que com luz de 700 nm. No entanto, a combinação de luz de 680 e 700 nm gera uma taxa de fotossíntese maior do que a luz de cada um dos comprimentos de onda isoladamente. Explique.

2. Planilha de balanço da fotossíntese Em 1804, Theodore de Saussure observou que o peso total (de oxigênio e de matéria orgânica seca) produzido pelas plantas é maior do que o peso de dióxido de carbono consumido durante a fotossíntese. De onde vem o peso extra?

3. O papel do H₂S em algumas bactérias fotossintéticas Bactérias púrpuras sulfurosas,* quando iluminadas, realizam a fotossíntese na presença de H₂O e de ¹⁴CO₂, mas apenas se H₂S é adicionado e O₂ é removido. Durante o curso da fotossíntese, medida pela formação de [¹⁴C]carboidratos, o H₂S é convertido em enxofre elementar, mas nenhum O₂ é produzido. Qual o papel da conversão de H₂S em enxofre? Por que nenhum O₂ é produzido?

4. O aumento do poder redutor do fotossistema I pela absorção de luz Quando o fotossistema I absorve luz vermelha a 700 nm, o potencial de redução padrão do P700 muda de 0,40 V para cerca de -1,2 V. Que fração da luz absorvida é aprisionada na forma de força redutora?

5. Fluxo de elétrons pelos fotossistemas I e II Preveja como um inibidor da passagem de elétrons pela feofitina afetaria o fluxo de elétrons (a) pelo fotossistema II e (b) pelo fotossistema I. Explique o seu raciocínio.

6. Síntese limitada de ATP no escuro Em um experimento de laboratório, cloroplastos de espinafre são iluminados na ausência de ADP e P_i; a luz é então desligada e ADP e P_i são adi-

*N. de T. Os autores provavelmente se referem às bactérias verdes sulfurosas.

cionados. O ATP é sintetizado por um curto período de tempo no escuro. Explique esse achado.

7. Modo de ação do herbicida DCMU Quando cloroplastos são tratados com 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilureia (DCMU ou diuron), um herbicida potente, a liberação de O_2 e a fotofosforilação cessam. A liberação de O_2 , mas não a fotofosforilação, pode ser restaurada pela adição de um aceptor externo de elétrons, ou reagente de Hill. De que forma o DCMU age como exterminador de plantas daninhas? Sugira uma localização para a ação inibitória desse herbicida no esquema mostrado na Figura 20-16. Explique.

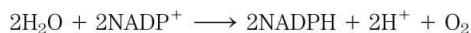
8. Efeito da venturicidina na liberação de oxigênio A venturicidina é um inibidor poderoso da ATP-sintase do cloroplasto, interagindo com a porção CF_0 da enzima e bloqueando a passagem de prótons pelo complexo CF_0CF_1 . Como a venturicidina afetaria a liberação de oxigênio em uma suspensão de cloroplastos bem iluminados? A sua resposta mudaria se o experimento fosse feito na presença de um reagente desacoplador, como o 2,4-dinitrofenol (DNP)? Explique.

9. Bioenergética da fotofosforilação As concentrações de ATP, ADP e P_i em equilíbrio estacionário em cloroplastos isolados de espinafre sob iluminação plena a pH 7 são 120,0; 6,0; e 700,0 μM , respectivamente.

- Qual a energia livre necessária para a síntese de 1 mol de ATP nestas condições?
- A energia para a síntese de ATP é fornecida pela transferência de elétrons induzida pela luz nos cloroplastos. Qual a variação mínima de voltagem necessária (durante a transferência de um par de elétrons) para sintetizar ATP nessas condições? (Talvez você precise consultar a Equação 13-7, p. 521.)

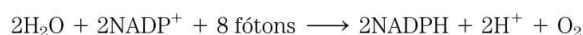
10. Energia luminosa para uma reação redox Suponha que você tenha isolado um novo microrganismo fotossintético que oxida H_2S e passa os elétrons ao NAD^+ . Luz de qual comprimento de onda forneceria energia suficiente para o H_2S reduzir o NAD^+ sob condições-padrão? Assuma 100% de eficiência no evento fotoquímico e use E'° de -243 mV para o H_2S e -320 mV para o NAD^+ . Ver Figura 20-7 para os equivalentes de energia da luz de diferentes comprimentos de onda.

11. Constante de equilíbrio para as reações de quebra da água A coenzima $NADP^+$ é o aceptor final de elétrons nos cloroplastos, de acordo com a reação



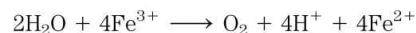
Use as informações no Capítulo 19 (Tabela 19-2) para calcular a constante de equilíbrio para esta reação a $25^\circ C$. (A relação entre K'_{eq} e $\Delta G'^\circ$ é discutida na p. 498.) De que forma o cloroplasto pode superar esse equilíbrio desfavorável?

12. Energética da fototransdução Durante a fotossíntese, oito fótons precisam ser absorvidos (quatro em cada fotossistema) para cada molécula de O_2 produzida:



Assumindo que esses fótons tenham um comprimento de onda de 700 nm (em vermelho) e que a absorção de luz e o uso da energia luminosa são 100% eficientes, calcule a variação de energia livre para o processo.

13. Transferência de elétrons para um reagente de Hill Cloroplastos isolados de espinafre liberam O_2 quando iluminados na presença de ferricianeto de potássio (um reagente de Hill), de acordo com a equação



em que Fe^{3+} representa ferricianeto e Fe^{2+} , ferrocianeto. NADPH é produzido neste processo? Explique.

14. Com que frequência uma molécula de clorofila absorve um fóton? A quantidade de clorofila *a* (M_r 892) em uma folha de espinafre é de cerca de 20 $\mu g/cm^2$ de superfície foliar. Sob luz solar de meio-dia (quando a energia média atingindo a folha é de 5,4 $J/cm^2 \cdot min$), a folha absorve cerca de 50% da radiação. Com que frequência uma única molécula de clorofila absorve um fóton? Considerando que o tempo de vida médio de uma molécula excitada de clorofila *in vivo* é 1 ns, que fração das moléculas de clorofila está excitada em um momento qualquer?

15. Efeito da luz monocromática no fluxo de elétrons A extensão na qual um carreador de elétrons é oxidado ou reduzido durante a transferência fotossintética de elétrons algumas vezes pode ser observada diretamente com um espectrofotômetro. Quando os cloroplastos são iluminados com luz de 700 nm, citocromo *f*, plastocianina e plastoquinona são oxidados. No entanto, quando os cloroplastos são iluminados com luz de 680 nm, esses carreadores de elétrons são reduzidos. Explique.

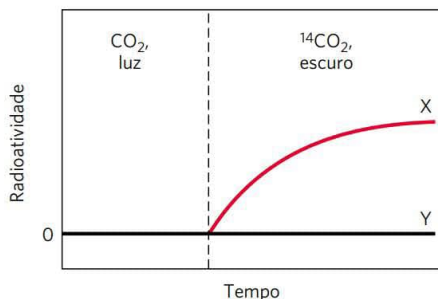
16. Função da fotofosforilação cíclica Quando a razão $[NADPH]/[NADP^+]$ nos cloroplastos é alta, a fotofosforilação é predominantemente cíclica (ver Figura 20-16). O_2 é liberado durante a fotofosforilação cíclica? NADPH é produzido? Explique. Qual a principal função da fotofosforilação cíclica?

17. Segregação do metabolismo nas organelas Quais são as vantagens para uma célula vegetal de ter diferentes organelas para realizar diferentes sequências de reações com intermediários em comum?

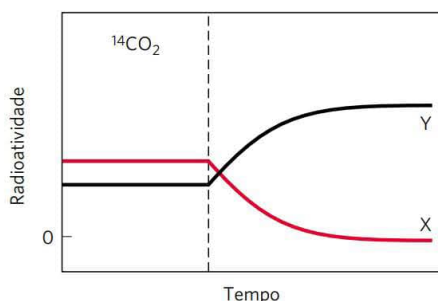
18. Fases da fotossíntese Quando uma suspensão de algas verdes é iluminada na ausência de CO_2 e então incubada com $^{14}CO_2$ no escuro, o $^{14}CO_2$ é convertido em $[^{14}C]$ glicose por um tempo curto. Qual o significado dessa observação com relação ao processo de assimilação de CO_2 e como ela está relacionada às reações fotodependentes da fotossíntese? Por que a conversão de $^{14}CO_2$ em $[^{14}C]$ glicose cessa depois de um curto período?

19. Identificação de intermediários-chave na assimilação de CO_2 Calvin e colaboradores usaram a alga verde unicelular *Chlorella* para estudar as reações de assimilação de carbono da fotossíntese. Eles incubaram $^{14}CO_2$ com suspensões iluminadas de algas e acompanharam o curso temporal de aparecimento de ^{14}C em dois compostos, X e Y, sob dois conjuntos de condições. Sugira as identidades de X e Y com base em sua compreensão do ciclo de Calvin.

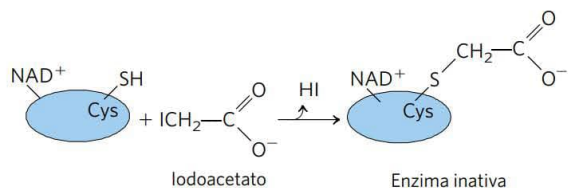
- Células iluminadas de *Chlorella* foram cultivadas com CO_2 não marcado; a luz foi, então, desligada, e $^{14}CO_2$ foi adicionado (linha tracejada vertical no gráfico a seguir). Nessas condições, X foi o primeiro composto a ficar marcado com ^{14}C ; Y não estava marcado.



- (b) Células iluminadas de *Chlorella* foram cultivadas com $^{14}\text{CO}_2$. A iluminação foi mantida até que todo o $^{14}\text{CO}_2$ tivesse desaparecido (linha tracejada vertical no gráfico a seguir). Nessas condições, X tornou-se rapidamente marcado, mas perdeu sua radioatividade com o tempo, ao passo que Y se tornou mais radioativo com o tempo.



- 20. Regulação do ciclo de Calvin** O iodoacetato reage irreversivelmente com os grupos $-\text{SH}$ livres dos resíduos de Cys nas proteínas. Preveja que enzima(s) do ciclo de Calvin seria(m) inibida(s) por iodoacetato e explique por quê.



- 21. Comparação das vias redutora e oxidativa das pentoses-fosfato** A via *redutora* das pentoses-fosfato gera uma série de intermediários idênticos aos da via *oxidativa* das pentoses-fosfato (Capítulo 14). Que papel cada via desempenha nas células onde é ativa?

- 22. Fotorrespiração e respiração mitocondrial** Compare o ciclo fotossintético oxidativo do carbono (ciclo C_2), também chamado de *fotorrespiração*, com a *respiração mitocondrial*, que promove a síntese de ATP. Por que ambos os processos são denominados respiração? Em que parte da célula eles ocorrem e sob que circunstâncias? Qual a via de fluxo de elétrons em cada processo?

- 23. O papel da sedoeptulose-1,7-bisfosfatase** Que efeito na célula ou no organismo pode acarretar um defeito na sedoeptulose-1,7-bisfosfatase em (a) um hepatócito humano e em (b) uma célula foliar de uma planta verde?

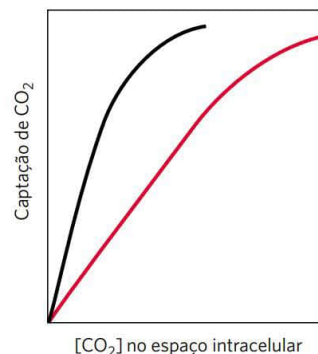
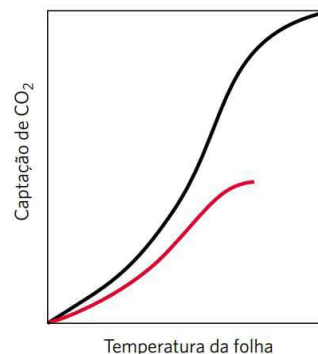
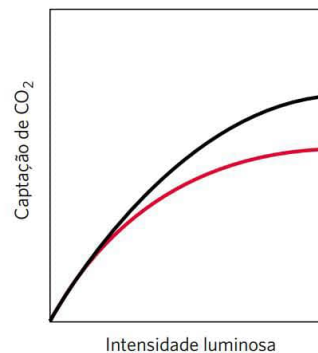
- 24. A via de assimilação do CO_2 no milho** Se uma planta de milho é iluminada na presença de $^{14}\text{CO}_2$, depois de cerca de 1 segundo, mais de 90% de toda a radioatividade incorporada

nas folhas são encontrados no C-4 do malato, do aspartato e do oxalacetato. Apenas após 60 segundos é que o ^{14}C aparece no C-1 do 3-fosfoglicerato. Explique.

- 25. Identificando as plantas CAM** De posse de algum $^{14}\text{CO}_2$ e de todas as ferramentas normalmente presentes em um laboratório de pesquisa em bioquímica, como você delinearia um experimento simples para determinar se uma planta é uma típica C_4 ou uma CAM?

- 26. Química da enzima málica: variação sobre um tema** A enzima málica, encontrada nas células da bainha vascular das plantas C_4 , realiza uma reação que tem uma análoga no ciclo do ácido cítrico. Qual a reação análoga? Explique sua escolha.

- 27. Diferenças entre plantas C_3 e C_4** O gênero vegetal *Atriplex* inclui algumas espécies de plantas C_3 e algumas espécies C_4 . A partir dos dados nos gráficos que seguem (espécie 1, curva preta; espécie 2, curva vermelha), identifique qual é uma planta C_3 e qual é uma planta C_4 . Justifique sua resposta em termos moleculares que levem em consideração os dados em todas as três curvas.



28. A via C_4 em uma única célula Em plantas C_4 típicas, a captura inicial do CO_2 ocorre em um tipo de célula, e as reações do ciclo de Calvin, em outro (ver Figura 20-50). Voznesenskaya e colaboradores descreveram uma planta, *Bienertia cycloptera* – que cresce em depressões salinas de semidesertos na Ásia Central –, que mostra as propriedades bioquímicas de uma planta C_4 , mas que, ao contrário das plantas C_4 típicas, não segrega as reações de fixação de CO_2 em dois tipos de células. A PEP-carboxilase e a rubisco estão presentes na mesma célula. No entanto, as células têm dois tipos de cloroplastos, diferentemente localizados. Um tipo, relativamente pobre em tilacoides de grana, está confinado à periferia; os cloroplastos mais típicos estão agrupados no centro da célula, separados dos cloroplastos periféricos por grandes vacúolos. Pontes estreitas citosólicas passam através dos vacúolos, conectando o citosol periférico e o central. Uma micrografia de uma célula de folha de *B. cycloptera*, com setas apontando para os cloroplastos periféricos, é mostrada a seguir.



Fonte: cortesia do Dr. Gerald Edwards, School of Biological Sciences, Washington State University.

Nesta planta, onde você esperaria encontrar (a) PEP-carboxilase, (b) rubisco e (c) grânulos de amido? Explique suas respostas com um modelo para a fixação de CO_2 nestas células C_4 . [Fonte: informação obtida de E. V. Voznesenskaya et al., *Plant J.* 31:649, 2002.]

29. O custo de armazenar glicose como amido Escreva a sequência de etapas e a reação resultante necessária para calcular o custo, em moléculas de ATP, da conversão de uma molécula de glicose-6-fosfato citosólica em amido e de volta em glicose-6-fosfato. Que fração esse custo representa do número máximo de moléculas de ATP disponível para o catabolismo completo da glicose-6-fosfato a CO_2 e H_2O ?

30. Pirofosfatase inorgânica A enzima pirofosfatase inorgânica contribui para tornar muitas reações biossintéticas que geram pirofosfato inorgânico essencialmente irreversíveis em células. Mantendo a concentração de PP_i muito baixa, a enzima “puxa” as reações na direção da formação de PP_i . A síntese de ADP-glicose em cloroplastos é uma dessas reações. No entanto, a síntese de UDP-glicose no citosol vegetal, que também produz PP_i , é prontamente reversível *in vivo*. Como você concilia esses dois fatos?

31. Regulação da síntese de amido e sacarose A síntese de sacarose ocorre no citosol, e a síntese de amido, no estroma do cloroplasto; mesmo assim, os dois processos estão intrinsecamente equilibrados. Que fatores deslocam as reações em favor (a) da síntese de amido e (b) da síntese de sacarose?

32. Regulação da síntese de sacarose Na regulação da síntese de sacarose a partir das trioses-fosfato produzidas durante a fotossíntese, 3-fosfoglicerato e P_i desempenham papéis fundamentais (ver Figura 20-52). Explique por que a concentração desses dois reguladores reflete a velocidade da fotossíntese.

33. Sacarose e cáries dentárias A infecção humana mais prevalente em uma escala global é a cárie dentária, que decorre da colonização e da destruição do esmalte do dente por uma variedade de microrganismos acidificadores. Esses organismos sintetizam e vivem dentro de uma rede de dextranas insolúveis em água, chamada de placa dentária, composta por polímeros de glicose com ligações ($\alpha 1 \rightarrow 6$) com muitos pontos de ramificação ($\alpha 1 \rightarrow 3$). A polimerização da dextrana requer sacarose da dieta, e a reação é catalisada por uma enzima bacteriana, dextrana-sacarose-glicosil-transferase.

- Escreva a reação global para a polimerização da dextrana.
- Além de fornecer um substrato para a formação da placa dentária, de que forma a sacarose da dieta também provê as bactérias orais com abundante fonte de energia metabólica?

34. Partição entre os ciclos do ácido cítrico e do glicoxilato Em um organismo (como *E. coli*) que tem o ciclo do ácido cítrico e o ciclo do glicoxilato, o que determina em qual dessas vias o isocitrato entrará?

Problema de análise de dados

35. Fotofosforilação: descoberta, rejeição e redescoberta Nos anos de 1930 e 1940, pesquisadores estavam começando a progredir na direção da compreensão do mecanismo da fotossíntese. Naquela época, o papel das “ligações fosfato ricas em energia” (hoje, “ATP”) na glicólise e na respiração celular estava apenas começando a ser conhecido. Havia muitas teorias sobre o mecanismo da fotossíntese, principalmente sobre o papel da luz. Este problema focaliza aquilo que era então chamado de “processo fotoquímico primário” – ou seja, o que exatamente a energia da luz capturada produz na célula fotossintética. É interessante que uma parte importante do modelo moderno da fotossíntese foi proposta cedo, apenas para ser rejeitada, ignorada por vários anos e, então, finalmente reavivada e aceita.

Em 1944, Emerson, Stauffer e Umbreit propuseram que “a função da energia luminosa na fotossíntese é a formação de ligações fosfato ricas em energia” (p. 107). No modelo deles (de agora em diante, “modelo de Emerson”), a energia livre necessária para impulsionar a fixação e a redução do CO_2 vinha dessas “ligações fosfato ricas em energia” (i.e., ATP), produzidas como resultado da absorção de luz por uma proteína contendo clorofila.

Esse modelo foi rejeitado explicitamente por Rabinowitch (1945). Depois de resumir os achados de Emerson e colaboradores, Rabinowitch afirmou: “até que evidências mais positivas sejam fornecidas, estamos inclinados a considerar como mais convincente um argumento geral contra esta hipótese, que pode ser derivado de considerações energéticas. A fotossíntese é eminentemente um problema de *acúmulo* de energia. Qual a vantagem, então, de converter quanta de luz (mesmo aqueles da luz vermelha, que chegam a cerca de 43 kcal por einstein) em ‘quanta de fosfato’ de apenas 10 kcal por mol? Isso parece ser uma largada na direção errada – em direção à *dissipação*, em vez de em direção ao *acúmulo* de energia” (p. 228). Esse argumento, junto com outras evidências, levou ao abandono do

modelo de Emerson até a década de 1950, quando se viu que era correto – embora em uma forma modificada.

Para cada informação do artigo de Emerson e colaboradores apresentada de (a) a (d), responda às três questões que seguem:

1. Como é que essas informações sustentam o modelo de Emerson, no qual a energia da luz é usada diretamente pela clorofila para *fazer ATP*, e o ATP então fornece a energia para promover a fixação e a redução do CO_2 ?
 2. Como Rabinowitch explicaria essas informações, com base em seu modelo (e na maioria dos outros modelos da época), no qual a energia da luz é usada diretamente pela clorofila para *produzir compostos redutores*? Rabinowitch escreveu: “teoricamente, não existe razão por que *toda* a energia eletrônica contida em moléculas excitadas pela absorção de luz não deveria estar disponível para oxidação-redução” (p. 152). Nesse modelo, os compostos reduzidos são, então, utilizados para fixar e reduzir CO_2 , e a energia para essas reações vem das grandes quantidades de energia livre liberadas pelas reações de redução.
 3. De que forma essas informações são explicadas pelo entendimento moderno da fotossíntese?
- (a) A clorofila contém um íon Mg^{2+} , conhecido por ser um cofator essencial para muitas enzimas que catalisam reações de fosforilação e desfosforilação.
- (b) Uma “proteína clorofila” bruta isolada de células fotossintéticas mostrou atividade fosforilante.
- (c) A atividade fosforilante da “proteína clorofila” foi inibida pela luz.
- (d) Os níveis de diferentes compostos fosforilados em células fotossintéticas mudaram dramaticamente em resposta à

exposição à luz. (Emerson e colaboradores não foram capazes de identificar os compostos específicos envolvidos.)

No final das contas, os modelos de Emerson e Rabinowitch estavam ambos parcialmente corretos e parcialmente incorretos.

- (e) Explique como os dois modelos se relacionam ao modelo atual da fotossíntese.

Em sua rejeição do modelo de Emerson, Rabinowitch foi além e disse: “a dificuldade da teoria do armazenamento de fosfato aparece mais claramente quando se considera o fato de que, sob luz fraca, oito ou dez quanta de luz são suficientes para reduzir uma molécula de dióxido de carbono. Se cada quantum fosse produzir uma molécula de fosfato de alta energia, a energia acumulada seria de apenas 80 a 100 kcal por einstein – enquanto a fotossíntese requer *pelo menos* 112 kcal por mol e provavelmente mais, devido às perdas em reações parciais irreversíveis” (p. 228).

- (f) De que forma o valor de Rabinowitch de 8 a 10 fótons por molécula reduzida de CO_2 se compara com o valor hoje aceito?
- (g) Como você rebateria o argumento de Rabinowitch, com base no conhecimento atual sobre a fotossíntese?

Referências

Emerson, R.L., J.F. Stauffer e W.W. Umbreit. 1944. Relationships between phosphorylation and photosynthesis in *Chlorella*. *Am. J. Botany* 31:107–120.

Rabinowitch, E.I. 1945. *Photosynthesis and Related Processes*, Vol. I. Interscience Publishers, New York.

Biossíntese de lipídeos

- 21.1 Biossíntese de ácidos graxos e eicosanoides 811
- 21.2 Biossíntese de triacilgliceróis 826
- 21.3 Biossíntese de fosfolipídeos de membrana 830
- 21.4 Colesterol, esteroides e isoprenoides: biossíntese, regulação e transporte 837

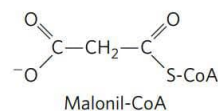
Os lipídeos desempenham uma variedade de funções celulares, algumas delas apenas recentemente reconhecidas. Eles são a principal forma de armazenamento de energia na maioria dos organismos e os principais constituintes das membranas celulares. Lipídeos especializados atuam como pigmentos (retinal, caroteno), cofatores (vitamina K), detergentes (sais biliares), transportadores (dolicóis), hormônios (derivados da vitamina D, hormônios sexuais), mensageiros extracelulares e intracelulares (eicosanoides, derivados do fosfatidilinositol) e âncoras para proteínas de membrana (ácidos graxos ligados covalentemente, grupos prenila e fosfatidilinositol). A capacidade de sintetizar uma variedade de lipídeos é essencial para todos os organismos. Este capítulo descreve as vias biossintéticas para alguns dos lipídeos celulares mais comuns, ilustrando as estratégias utilizadas para sintetizar esses produtos insolúveis em água a partir de precursores hidrossolúveis, como o acetato. Assim como outras vias biossintéticas, essas sequências de reações são endergônicas e redutoras. Elas utilizam ATP como fonte de energia metabólica e um transportador de elétrons reduzido (geralmente o NADPH) como agente redutor.

Primeiramente, será descrita a biossíntese dos ácidos graxos, os principais componentes dos triacilgliceróis e dos fosfolipídeos; a seguir, será examinada a montagem dos ácidos graxos em triacilgliceróis e nos tipos mais simples de fosfolipídeos de membrana. Finalmente, será abordada a síntese do colesterol, componente de algumas membranas e precursor de esteroides, como os ácidos biliares, os hormônios sexuais e os hormônios supracorticais.

21.1 Biossíntese de ácidos graxos e eicosanoides

Após a descoberta de que a oxidação dos ácidos graxos ocorre pela remoção oxidativa e sucessiva de unidades

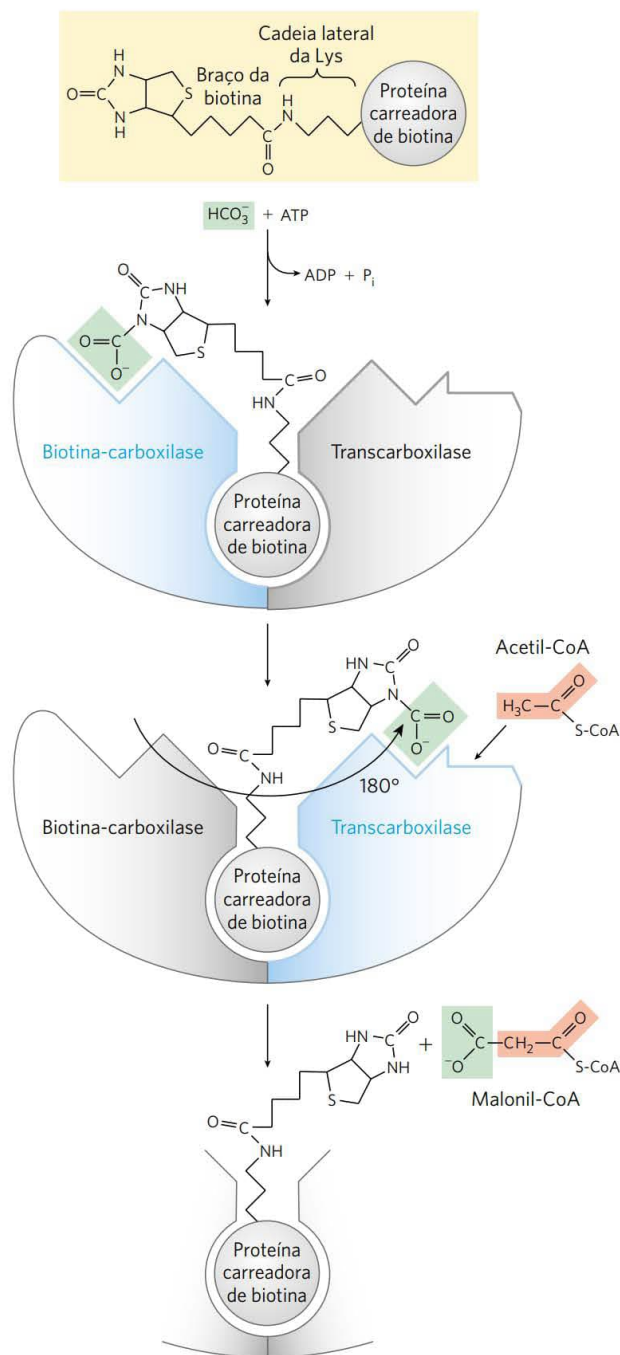
com dois átomos de carbono (acetil-CoA) (ver Figura 17-8), os bioquímicos pensaram que a biossíntese dos ácidos graxos poderia ocorrer pela simples inversão dos mesmos passos enzimáticos. No entanto, como eles vieram a descobrir, a biossíntese e a degradação dos ácidos graxos ocorrem por meio de diferentes vias, são catalisadas por diferentes grupos de enzimas e localizam-se em compartimentos distintos na célula. Além disso, a biossíntese requer a participação de um intermediário de três carbonos, a **malonil-CoA**, que não está envolvido na degradação dos ácidos graxos.



A via de síntese de ácidos graxos e sua regulação serão descritas agora. Consideraremos a biossíntese de ácidos graxos de cadeia mais longa, de ácidos graxos insaturados e seus derivados eicosanoides no final desta seção.

A malonil-CoA é formada a partir de acetil-CoA e bicarbonato

A formação de malonil-CoA a partir de acetil-CoA é um processo irreversível, catalisado pela **acetil-CoA-carboxilase**. A enzima bacteriana contém três subunidades polipeptídicas distintas (**Figura 21-1**); em células animais, todas as três atividades fazem parte de um único polipeptídeo multifuncional. As células vegetais têm os dois tipos de acetil-CoA-carboxilase. Em todos os casos, a enzima contém um grupo prostético, a biotina, covalentemente ligado por uma ligação amida ao grupo ε-amino de um resíduo de Lys presente em um dos três polipeptídeos ou domínios da molécula da enzima. A reação em duas etapas catalisada por essa enzima é muito semelhante a outras reações de carboxilação dependente de biotina, como aquelas catalisadas pela piruvato-carboxilase (ver Figura 16-17) e pela propionil-CoA-carboxilase (ver Figura 17-12). Primeiro, um grupo carboxila derivado do bicarbonato (HCO_3^-) é transferido para a biotina em uma reação dependente de ATP. O grupo biotinila age como transportador temporário de CO_2 , transferindo-o para a acetil-CoA na segunda etapa, gerando malonil-CoA.



A síntese dos ácidos graxos ocorre em uma sequência de reações que se repetem

Em todos os organismos, as longas cadeias de carbono dos ácidos graxos são construídas por uma sequência de reações repetitivas, em quatro etapas (**Figura 21-2**), catalisadas por um sistema coletivamente conhecido como **ácido graxo-sintase**. Um grupamento acila saturado, produzido em cada série de reações em quatro etapas, torna-se o substrato da condensação subsequente com um grupo malonila

FIGURA 21-1 A reação da acetil-CoA-carboxilase. A acetil-CoA-carboxilase contém três regiões funcionais: a proteína carreadora de biotina (em cinza); a biotina-carboxilase, que ativa CO_2 pela sua ligação a um átomo de nitrogênio no anel da biotina em uma reação dependente de ATP (ver Figura 16-17); e a transcarboxilase, que transfere o CO_2 ativado (sombreado em verde) da biotina para a acetil-CoA, produzindo malonil-CoA. Parte da proteína carreadora de biotina e o braço longo e flexível contendo biotina giram, transportando o CO_2 ativado do sítio ativo da biotina-carboxilase para o sítio ativo da transcarboxilase. A enzima ativa, em cada etapa, está sombreada em azul.

ativado. Em cada uma das passagens pelo ciclo, a cadeia do grupo acila graxo aumenta em dois carbonos.

Na sequência anabólica redutora, tanto o cofator transportador de elétrons quanto os grupos ativadores diferem daqueles do processo catabólico oxidativo. Lembre-se de que, na β -oxidação, NAD^+ e FAD atuam como aceptores de elétrons e o grupo ativador é o grupo tiol ($-\text{SH}$) da coenzima A (ver Figura 17-8). Por outro lado, o agente redutor na via sintética é o NADPH e os grupos ativadores são dois grupos $-\text{SH}$ diferentes ligados à enzima, como descrito a seguir.

Existem duas variantes principais da enzima ácido graxo-sintase: a ácido graxo-sintase I (AGS I), encontrada em vertebrados e fungos, e a ácido graxo-sintase II (AGS II), encontrada em vegetais e bactérias. A AGS I, encontrada em vertebrados, consiste em uma única cadeia polipeptídica multifuncional (M_r 240.000). A enzima AGS I de mamíferos é o protótipo. Sete sítios ativos para reações distintas estão presentes em domínios separados (**Figura 21-3a**). O polipeptídeo de mamíferos funciona como homodímero (M_r 480.000). As subunidades parecem agir independentemente. Quando todos os sítios ativos de uma subunidade são inativados por mutação, a síntese dos ácidos graxos é apenas moderadamente reduzida. A enzima AGS I encontrada em leveduras e outros fungos é um pouco diferente. Ela consiste em dois polipeptídeos multifuncionais que formam um complexo com uma arquitetura distinta do sistema em vertebrados (**Figura 21-3b**). Três dos sete sítios ativos necessários são encontrados na subunidade α e quatro na subunidade β .

Com o sistema da AGS I, a síntese dos ácidos graxos leva a um único produto, e não são liberados intermediários. Quando o comprimento da cadeia atinge 16 carbonos, esse produto (palmitato, 16:0; ver Tabela 10-1) deixa o ciclo. Os carbonos C-16 e C-15 do palmitato são derivados dos átomos de carbono dos grupos metila e carboxila, respectivamente, de uma acetil-CoA utilizada diretamente para iniciar o sistema (**Figura 21-4**); os outros átomos de carbono da cadeia são originados da acetil-CoA via malonil-CoA.

A AGS II, de vegetais e bactérias, é um sistema dissociado; cada etapa da síntese é catalisada por uma enzima distinta e livremente difusível. Os intermediários também são difusíveis e podem ser desviados para outras vias (como a síntese de ácido lipoico). Ao contrário da AGS I, a enzima AGS II gera uma variedade de produtos, inclusive ácidos graxos saturados de vários comprimentos, assim como insaturados, ramificados e hidroxiácidos graxos. Um sistema AGS II também é encontrado nas mitocôndrias de vertebrados. A discussão a seguir terá como foco a enzima AGS I de mamíferos.

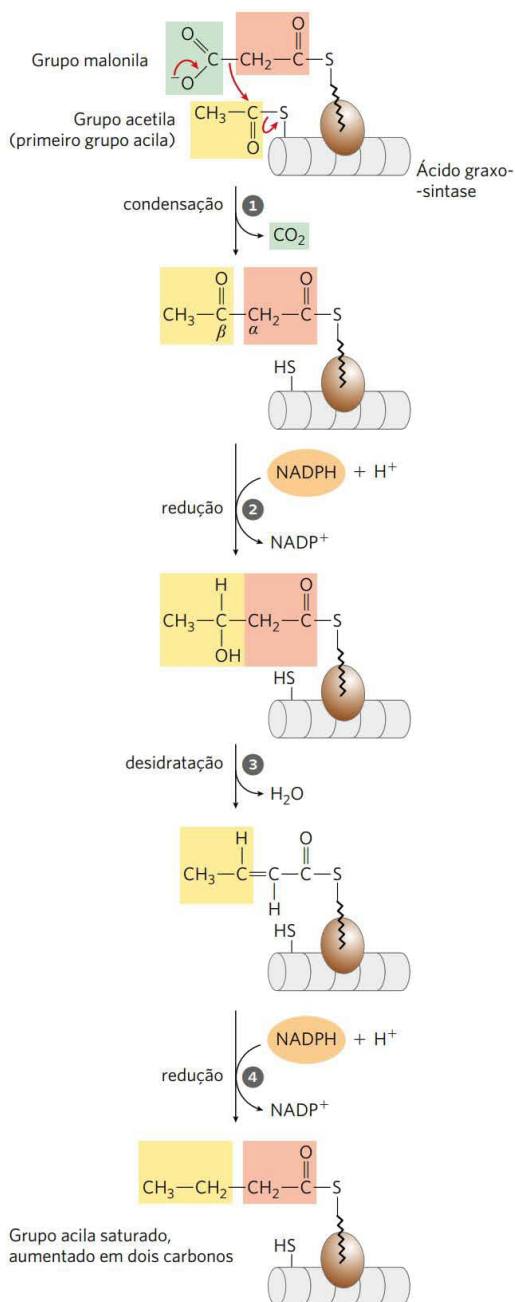


FIGURA 21-2 Adição de dois carbonos a uma cadeia acila em crescimento: uma sequência de quatro etapas.

Cada grupo malonila e acetila (ou acilas maiores) é ativado por um tioéster que os une a ácido graxo-sintase, um sistema multienzimático descrito no texto a seguir. ① A condensação de um grupo acila ativado (o grupo acetila da acetil-CoA é o primeiro grupo acila) e dois carbonos derivados da malonil-CoA, com a eliminação de CO_2 do grupo malonila, alonga a cadeia acila em dois carbonos. O mecanismo da primeira etapa dessa reação está mostrado para ilustrar o papel da descarboxilação em facilitar a condensação. O produto β -cetônico dessa condensação é, então, reduzido em três etapas seguintes praticamente idênticas às reações de β -oxidação, mas na sequência inversa; ② o grupo β -cetônico é reduzido a um álcool, ③ a eliminação de H_2O cria uma ligação dupla e ④ a ligação dupla é reduzida, formando o grupo acila graxo saturado correspondente.

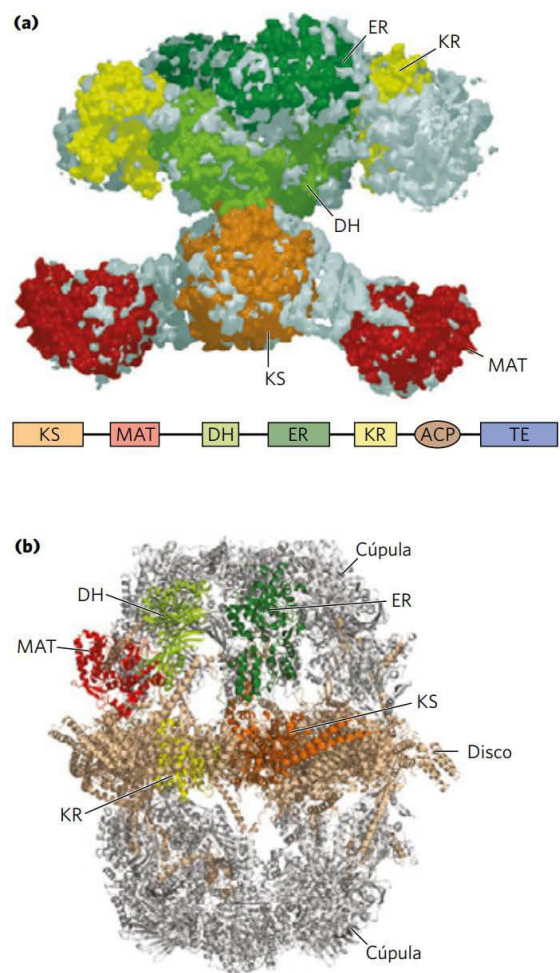


FIGURA 21-3 A estrutura do sistema do ácido graxo-sintase tipo I.

Aqui são mostradas estruturas de baixa resolução dos sistemas enzimáticos (a) de mamíferos (suíno) e (b) de fungo. (a) Todos os sítios ativos no sistema de mamíferos estão localizados em diferentes domínios de uma única e longa cadeia polipeptídica. As diferentes atividades enzimáticas são: β -cetoacil-ACP-sintase (KS), malonil/acetil-CoA-ACP-transferase (MAT), β -hidroxiacil-ACP-desidratase (DH), enoil-ACP-redutase (ER) e β -cetoacil-ACP-redutase (KR). ACP é a proteína carreadora de grupos acila. O arranjo linear dos domínios no polipeptídeo está representado no painel mais abaixo. O sétimo domínio (TE) é uma tioesterase que libera o palmitato produzido da ACP quando a síntese é finalizada. Os domínios ACP e TE não estão ordenados na estrutura cristalina e, conseqüentemente, não estão mostrados nesta estrutura.

(b) Na estrutura da AGS I do fungo *Thermomyces lanuginosus*, os mesmos sítios ativos são divididos entre duas cadeias polipeptídicas multifuncionais que atuam em conjunto. Seis cópias de cada polipeptídeo são encontradas no complexo heterododecamérico. Um disco de seis subunidades α , que inclui ACP, assim como os sítios ativos KS e KR, é encontrado no centro do complexo. No disco, três subunidades são encontradas em uma face, e três na outra. Nos dois lados do disco são formadas cúpulas por trímeros de subunidades β , contendo os sítios ativos ER e DH, assim como dois domínios com sítios ativos análogos a MAT na enzima de mamíferos. Os domínios de uma subunidade de cada tipo estão coloridos de acordo com as cores dos sítios ativos da enzima de mamíferos em (a). [Fontes: (a) dímero obtido de PDB ID 2CF2, T. Maier et al., *Science* 311:1258, 2006. (b) Obtido de PDB IDs 2UV9, 2UVA, 2UVB e 2UVC, S. Jenni et al., *Science* 316:254, 2007.]

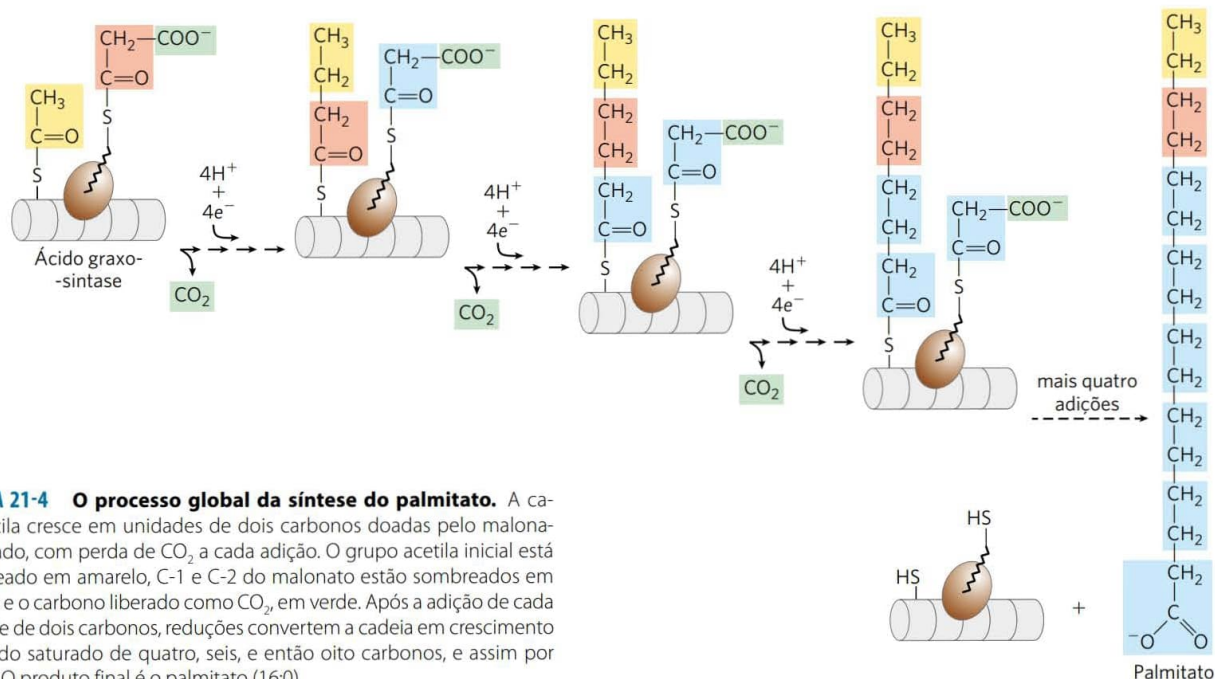


FIGURA 21-4 O processo global da síntese do palmitato. A cadeia acila cresce em unidades de dois carbonos doadas pelo malonato ativado, com perda de CO_2 a cada adição. O grupo acetila inicial está sombreado em amarelo, C-1 e C-2 do malonato estão sombreados em salmão e o carbono liberado como CO_2 , em verde. Após a adição de cada unidade de dois carbonos, reduções convertem a cadeia em crescimento em ácido saturado de quatro, seis, e então oito carbonos, e assim por diante. O produto final é o palmitato (16:0).

A ácido graxo-sintase de mamíferos tem múltiplos sítios ativos

Os múltiplos domínios da AGS I de mamíferos atuam como enzimas distintas, porém ligadas. O sítio ativo de cada enzima é encontrado em um domínio separado dentro do polipeptídeo maior. Ao longo do processo de síntese dos ácidos graxos, os intermediários permanecem covalentemente ligados como tioésteres a um de dois grupos tiol. Um ponto de ligação é o grupo —SH de um resíduo de Cys em um dos domínios da sintase (β -cetoacil-ACP-sintase; KS); o outro ponto é o grupo —SH de uma proteína transportadora de grupos acila, domínio distinto do mesmo polipeptídeo. A hidrólise dos tioésteres é altamente exergônica, e a energia liberada ajuda a tornar termodinamicamente favoráveis dois passos distintos (1 e 5 na Figura 21-6) da síntese dos ácidos graxos.

A **proteína transportadora de grupos acila** (ACP, do inglês, *acyl carrier protein*) é o transportador que mantém o sistema unido. A ACP de *Escherichia coli* é uma proteína pequena (M_r 8.860) contendo o grupo prostético **4'-fosfopanteteína** (Figura 21-5; comparar esse grupo com o ácido pantotênico e com a porção β -mercaptoetilamina da coenzima A na Figura 8-41). Acredita-se que o grupo prostético 4'-fosfopanteteína da ACP de *E. coli* funcione como um braço flexível, ancorando a cadeia crescente da acila à superfície do complexo da ácido graxo-sintase, enquanto leva os intermediários da reação de um sítio ativo para o próximo. A ACP de mamíferos tem função semelhante e o mesmo grupo prostético; como foi visto, no entanto, ela está

inserida como um domínio em um polipeptídeo multifuncional muito maior.

A ácido graxo-sintase recebe grupos acetila e malonila

Antes que as reações de condensação que constroem a cadeia do ácido graxo possam iniciar, os dois grupos tióis do complexo enzimático devem ser carregados com os grupos acila corretos (Figura 21-6, parte superior).

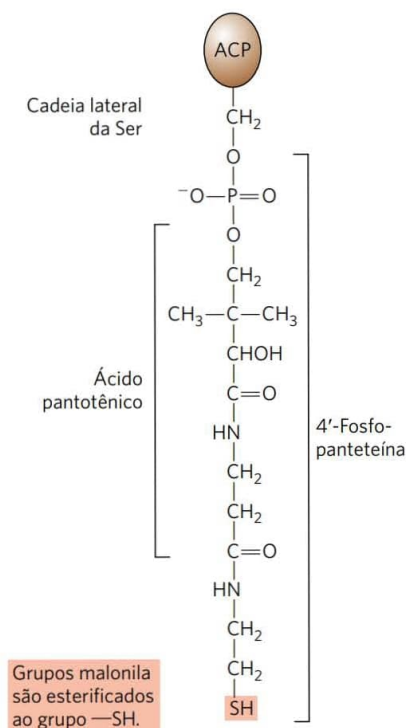
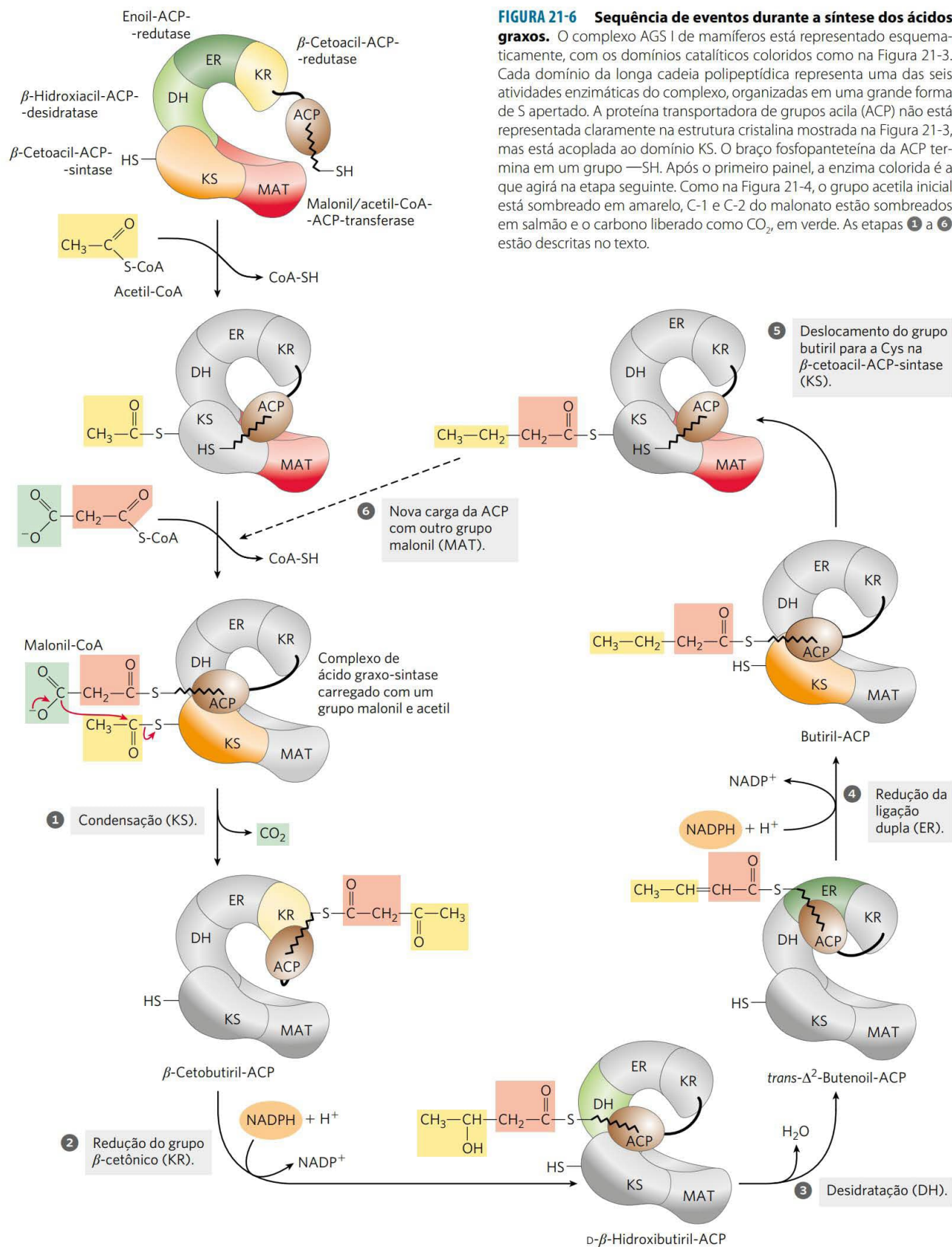


FIGURA 21-5 A proteína transportadora de grupos acila (ACP). O grupo prostético é a 4'-fosfopanteteína, covalentemente ligada ao grupo hidroxila de um resíduo de Ser da ACP. A fosfopanteteína contém ácido pantotênico, uma vitamina do complexo B, também encontrada na molécula da coenzima A. Seu grupo —SH é o local de entrada de grupos malonila durante a síntese dos ácidos graxos.



Primeiro, o grupo acetila da acetil-CoA é transferido para a ACP, em uma reação catalisada pelo domínio **malonil/acetil-CoA-ACP-transferase** (MAT) do polipeptídeo multifuncional. O grupo acetila é, então, transferido para o grupo —SH da Cys da **β -cetoacil-ACP-sintase** (KS). A segunda reação, a transferência do grupo malonila da malonil-CoA para o grupo —SH da ACP, também é catalisada pela malonil/acetil-CoA-ACP-transferase. No complexo sintase carregado, os grupos acetila e malonila são ativados para o processo de alongamento da cadeia. Consideraremos agora em certo detalhe os quatro primeiros passos desse processo; os números das etapas referem-se à Figura 21-6.

Etapas 1 Condensação A primeira reação na formação da cadeia de um ácido graxo é uma condensação de Claisen clássica envolvendo os grupos acetila e malonila ativados, formando **acetoacetil-ACP**, um grupo acetoacetila ligado à ACP pelo grupo —SH da fosfopantetina; simultaneamente, uma molécula de CO_2 é produzida. Nesta reação, catalisada pela β -cetoacil-ACP-sintase, o grupamento acetila é transferido do grupo —SH da Cys da enzima para o grupo malonila ligado ao grupo —SH da ACP, tornando-se a unidade de dois carbonos metil-terminal do novo grupo acetoacetila.

O átomo de carbono do CO_2 formado nessa reação é o mesmo carbono originalmente introduzido na malonil-CoA a partir do HCO_3^- pela reação da acetil-CoA-carboxilase (Figura 21-1). Assim, a ligação covalente do CO_2 durante a biossíntese dos ácidos graxos é apenas transitória; ele é removido assim que cada unidade de dois carbonos é adicionada.

Por que as células têm o trabalho de adicionar CO_2 para formar o grupo malonila a partir do grupo acetila apenas para perder o CO_2 durante a formação de acetoacetato? O uso de grupos malonila ativados, em vez de grupos acetila, é o que torna as reações de condensação termodinamicamente favoráveis. O carbono metileno (C-2) do grupo malonila, situado entre os carbonos da carbonila e da carboxila, forma um bom nucleófilo. Na etapa de condensação, a descarboxilação do grupo malonila facilita o ataque nucleofílico do carbono metileno sobre a ligação tioéster entre o grupo acetila e a β -cetoacil-ACP-sintase, deslocando o grupo —SH da enzima. (Essa é uma condensação de Claisen clássica; ver Figura 13-4.) O acoplamento da condensação à descarboxilação do grupo malonila torna o processo global altamente exergônico. Uma sequência semelhante de carboxilação-decarboxilação facilita a formação de fosfoenolpiruvato a partir de piruvato na gliconeogênese (ver Figura 14-18).

Por meio do uso de grupos malonila ativados na síntese dos ácidos graxos e de acetato ativado em sua degradação, a célula torna os dois processos energeticamente favoráveis, apesar de um ser efetivamente o inverso do outro. A energia extra necessária para tornar a síntese dos ácidos graxos favorável é fornecida pelo ATP utilizado na síntese de malonil-CoA a partir de acetil-CoA e HCO_3^- (Figura 21-1).

Etapas 2 Redução do grupo carbonila A acetoacetil-ACP formada na etapa de condensação sofre agora redução do grupo carbonila em C-3, formando D- β -hidroxibutiril-ACP. Essa reação é catalisada pela **β -cetoacil-ACP-redutase** (KR) e o doador de elétrons é o NADPH. Observe que o grupo D- β -hidroxibutiril não tem a mesma forma estereoisomérica

que o intermediário L- β -hidroxiaçil na oxidação dos ácidos graxos (ver Figura 17-8).

Etapas 3 Desidratação Os elementos da água são agora removidos dos carbonos C-2 e C-3 da D- β -hidroxibutiril-ACP, formando uma ligação dupla no produto, **trans- Δ^2 -butenoil-ACP**. A enzima que catalisa essa desidratação é a **β -hidroxiaçil-ACP-desidratase** (DH).

Etapas 4 Redução da ligação dupla Por fim, a ligação dupla da trans- Δ^2 -butenoil-ACP é reduzida (saturada), formando **butiril-ACP** pela ação da enzima **enoil-ACP-redutase** (ER); mais uma vez, NADPH é o doador de elétrons.

As reações do ácido graxo-sintase são repetidas para formar palmitato

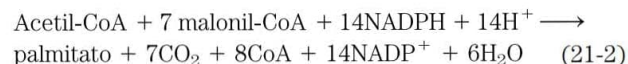
A produção de acil-ACP saturada, com quatro carbonos, marca a conclusão de uma rodada de reações no complexo do ácido graxo-sintase. Na etapa 5, o grupo butirila é transferido do grupo —SH da fosfopantetina da ACP para o grupo —SH de uma Cys da β -cetoacil-ACP-sintase, que inicialmente havia ligado o grupo acetila (Figura 21-6). Para dar início ao próximo ciclo de quatro reações que alonga a cadeia em mais dois átomos de carbono (etapa 6), outro grupo malonila liga-se ao grupo —SH da fosfopantetina da ACP, agora desocupado (Figura 21-7). A condensação ocorre à medida que o grupo butirila, atuando como o grupo acetila no primeiro ciclo, é ligado aos dois átomos de carbono do grupo malonil-ACP, com a consequente perda de CO_2 . O produto dessa condensação é um grupo acila com seis carbonos, covalentemente ligado ao grupo —SH da fosfopantetina. Seu grupo β -cetônico é reduzido nas três etapas seguintes do ciclo da sintase, formando um grupo acila saturado, exatamente como no primeiro ciclo de reações – neste caso, formando o produto de seis carbonos.

Sete ciclos de condensação e redução produzem o grupo palmitato de 16 carbonos saturados, ainda ligado à ACP. Por razões ainda não bem compreendidas, o alongamento da cadeia pelo complexo da sintase geralmente é interrompido neste ponto e o palmitato é liberado da ACP pela ação de uma atividade hidrolítica (tioesterase; TE) da proteína multifuncional.

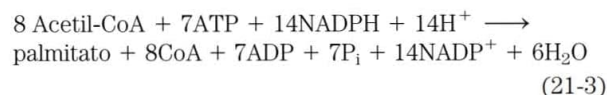
É possível considerar em duas partes a reação global para a síntese do palmitato a partir de acetil-CoA. Primeiro, a formação de sete moléculas de malonil-CoA:



em seguida, sete ciclos de condensação e redução:



Observe que apenas seis moléculas de água são produzidas, uma vez que uma é utilizada para hidrolisar a ligação tioéster entre o produto palmitato e a enzima. O processo global (a soma das Equações 21-1 e 21-2) é



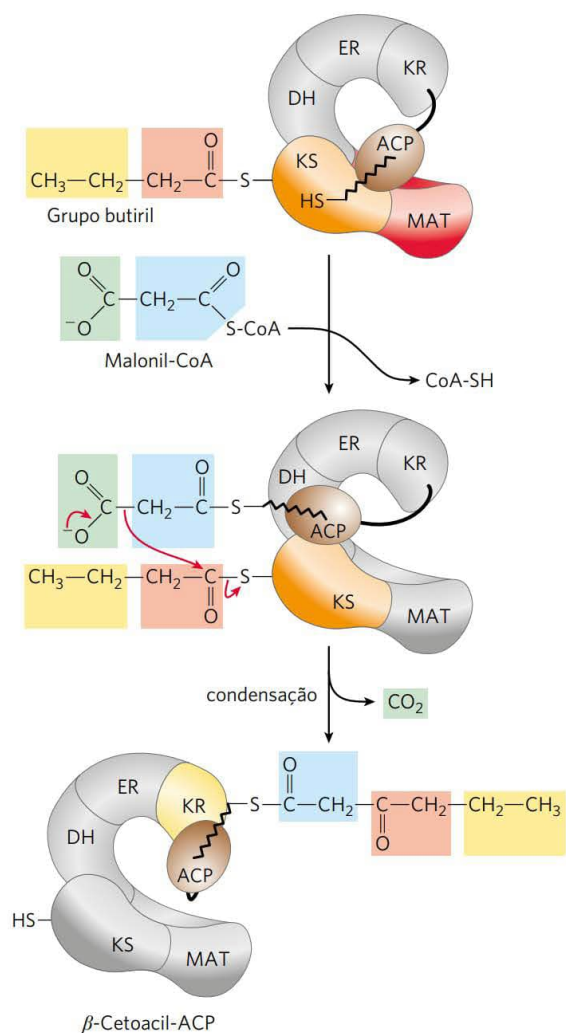


FIGURA 21-7 Início da segunda rodada do ciclo da síntese dos ácidos graxos. O grupo butíril está ligado ao grupo —SH da Cys. O grupo malonil que está entrando é primeiro acoplado ao grupo —SH da fosfopanteteína. A seguir, na etapa de condensação, todo o grupo butíril ligado ao —SH da Cys é trocado pelo grupo carboxila do resíduo de malonila, que é perdida como CO_2 (em verde). Esta etapa é análoga à etapa 1 na Figura 21-6. O produto, um grupo β -cetoacila de seis carbonos, contém agora quatro carbonos derivados de malonil-CoA e dois derivados da acetil-CoA que iniciou a reação. O grupo β -cetoacila passa então pelas etapas 2 a 4, como na Figura 21-6.

Assim, a biossíntese dos ácidos graxos, como o palmitato, requer acetil-CoA e o fornecimento de energia química de duas formas: o potencial de transferência de grupos do ATP e o poder redutor do NADPH. O ATP é necessário para ligar o CO_2 à acetil-CoA, formando malonil-CoA; as moléculas de NADPH são necessárias para reduzir o grupo β -cetônico e a ligação dupla.

Em eucariotos não fotossintéticos existe um custo adicional para a síntese dos ácidos graxos, já que a acetil-CoA é gerada na mitocôndria e deve ser transportada para o citosol. Como será visto, essa etapa extra consome dois ATP por molécula de acetil-CoA transportada, aumentando o custo

energético da síntese dos ácidos graxos para três ATP por unidade de dois carbonos.

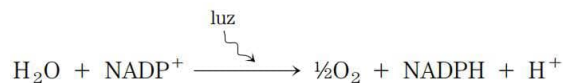
A síntese de ácidos graxos é um processo citosólico em muitos organismos, mas nas plantas ela acontece nos cloroplastos

Na maioria dos eucariotos superiores, o complexo do ácido graxo-sintase é encontrado exclusivamente no citosol (Figura 21-8), assim como as enzimas biossintéticas dos nucleotídeos, dos aminoácidos e da glicose. Esta localização segrega os processos sintéticos das reações de degradação, uma vez que muitas delas ocorrem na matriz mitocondrial. Existe uma separação correspondente dos cofatores transportadores de elétrons utilizados no anabolismo (geralmente processos redutivos) e aqueles utilizados no catabolismo (geralmente oxidativos).

Em geral, o NADPH é o transportador de elétrons para as reações anabólicas e o NAD^+ atua nas reações catabólicas. No citosol de hepatócitos, a relação $[\text{NADPH}]/[\text{NAD}^+]$ é muito alta (~ 75), gerando um ambiente fortemente redutor para a síntese redutora dos ácidos graxos e de outras biomoléculas. A relação citosólica $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+]$ é muito menor (apenas cerca de 8×10^{-4}), de modo que o catabolismo oxidativo da glicose, dependente de NAD^+ , pode ocorrer no mesmo compartimento e ao mesmo tempo que a síntese dos ácidos graxos. A relação $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+]$ é muito maior na mitocôndria do que no citosol, devido ao fluxo de elétrons para o NAD^+ a partir da oxidação de ácidos graxos, aminoácidos, piruvato e acetil-CoA. Essa relação alta entre $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+]$ na mitocôndria favorece a redução do oxigênio pela cadeia respiratória.

Nos hepatócitos e adipócitos, o NADPH citosólico é amplamente gerado pela via das pentoses-fosfato (ver Figura 14-22) e pela **enzima málica** (Figura 21-9a). Observe que a enzima málica ligada ao NADP, que opera na via de fixação do carbono em plantas C_4 (ver Figura 20-50), tem uma função diferente. O piruvato produzido na reação representada na Figura 21-9a entra novamente na mitocôndria. Nos hepatócitos e nas glândulas mamárias em lactação, o NADPH necessário para a biossíntese dos ácidos graxos é fornecido principalmente pela via das pentoses-fosfato (Figura 21-9b).

Nas células fotossintéticas dos vegetais, a síntese dos ácidos graxos não ocorre no citosol, e sim no estroma dos cloroplastos (Figura 21-8). Isso faz sentido, já que o NADPH é produzido nos cloroplastos pelas reações fotodependentes da fotossíntese:



O acetato é transportado para fora da mitocôndria como citrato

Em eucariotos não fotossintéticos, praticamente toda a acetil-CoA utilizada na síntese dos ácidos graxos é formada na mitocôndria a partir da oxidação do piruvato e do catabolismo dos esqueletos carbonados dos aminoácidos. A acetil-CoA gerada pela oxidação dos ácidos graxos não é



FIGURA 21-8 Localização subcelular do metabolismo lipídico. As células de leveduras e de animais diferem das células dos vegetais superiores na compartimentalização do metabolismo lipídico. A síntese dos ácidos graxos ocorre no compartimento em que NADPH está disponível para a síntese redutora (i.e., onde a relação [NADPH]/[NADP⁺] é alta); esse compartimento é o citosol nos animais e nas leveduras, e o cloroplasto nas plantas. Os processos escritos em vermelho são descritos neste capítulo.

uma fonte significativa de acetil-CoA para a biossíntese dos ácidos graxos em animais, pelo fato de que as duas vias são reguladas reciprocamente, como descrito a seguir.

A membrana interna da mitocôndria é impermeável à acetil-CoA, de modo que uma lançadeira indireta transfere os equivalentes do grupo acetila pela membrana interna (**Figura 21-10**). A acetil-CoA intramitocondrial reage primeiro com oxalacetato, formando citrato, uma reação do ciclo do ácido cítrico catalisada pela enzima **citrato-sintase** (ver Figura 16-9). O citrato, então, atravessa a membrana interna pelo **transportador de citrato**. No citosol, a clivagem do citrato pela **citrato-liase** regenera acetil-CoA e oxalacetato em uma reação dependente de ATP. O oxalacetato não pode retornar à matriz mitocondrial diretamente, já que não existe um transportador de oxalacetato. Em vez disso, a malato-desidrogenase citosólica reduz o oxalacetato a malato, o qual pode retornar à matriz mitocondrial pelo

transportador malato- α -cetoglutarato na troca por citrato. Na matriz, o malato é reoxidado a oxalacetato, completando o ciclo. No entanto, a maior parte do malato produzido no citosol é utilizada para gerar NADPH citosólico pela ação da enzima málica (**Figura 21-9a**). O piruvato produzido é transportado para a mitocôndria pelo transportador de piruvato (**Figura 21-10**), sendo convertido em oxalacetato na matriz pela enzima piruvato-carboxilase. O ciclo resultante consome dois ATP (pela citrato-liase e pela piruvato-carboxilase) para cada molécula de acetil-CoA entregue para a síntese de ácidos graxos. Após a clivagem do citrato para gerar acetil-CoA, a conversão dos quatro carbonos remanescentes em piruvato e CO₂ pela enzima málica gera aproximadamente a metade do NADPH necessário para a síntese de ácidos graxos. A via das pentoses-fosfato fornece o restante do NADPH necessário.

A biossíntese de ácidos graxos é regulada precisamente

Quando uma célula ou um organismo tem combustível metabólico mais que suficiente para suprir suas necessidades energéticas, geralmente o excesso é convertido em ácidos graxos e estocado na forma de lipídeos, como os triacilgliceróis. A reação catalisada pela acetil-CoA-carboxilase é a etapa limitante na biossíntese de ácidos graxos, e essa enzima é um ponto importante de regulação. Nos vertebrados, o principal produto da síntese de ácidos graxos, a palmitoil-CoA, é um inibidor por retroalimentação dessa enzima; o citrato é um ativador alostérico (**Figura 21-11a**), elevando a $V_{\text{máx}}$. O citrato desempenha uma função central na alteração do metabolismo celular de consumo de combustível metabólico (oxidação) para o de armazenamento de combustível na forma de ácidos graxos. Quando as concentrações de acetil-CoA e ATP mitocondriais aumentam, o citrato é transportado para fora da mitocôndria; ele torna-se, então, tanto o precursor de acetil-CoA citosólica quanto um sinal alostérico para a ativação da acetil-CoA-

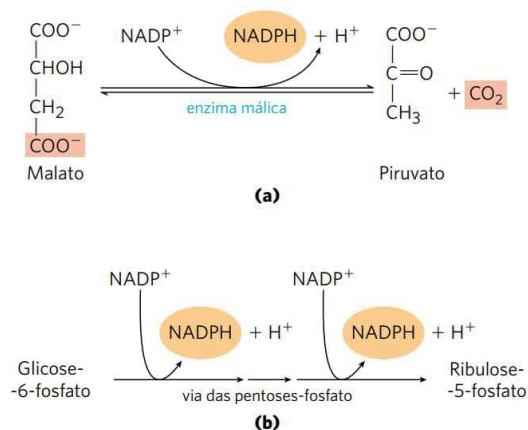


FIGURA 21-9 Produção de NADPH. Duas vias para a produção de NADPH, catalisadas pela **(a)** enzima málica e **(b)** via das pentoses-fosfato.

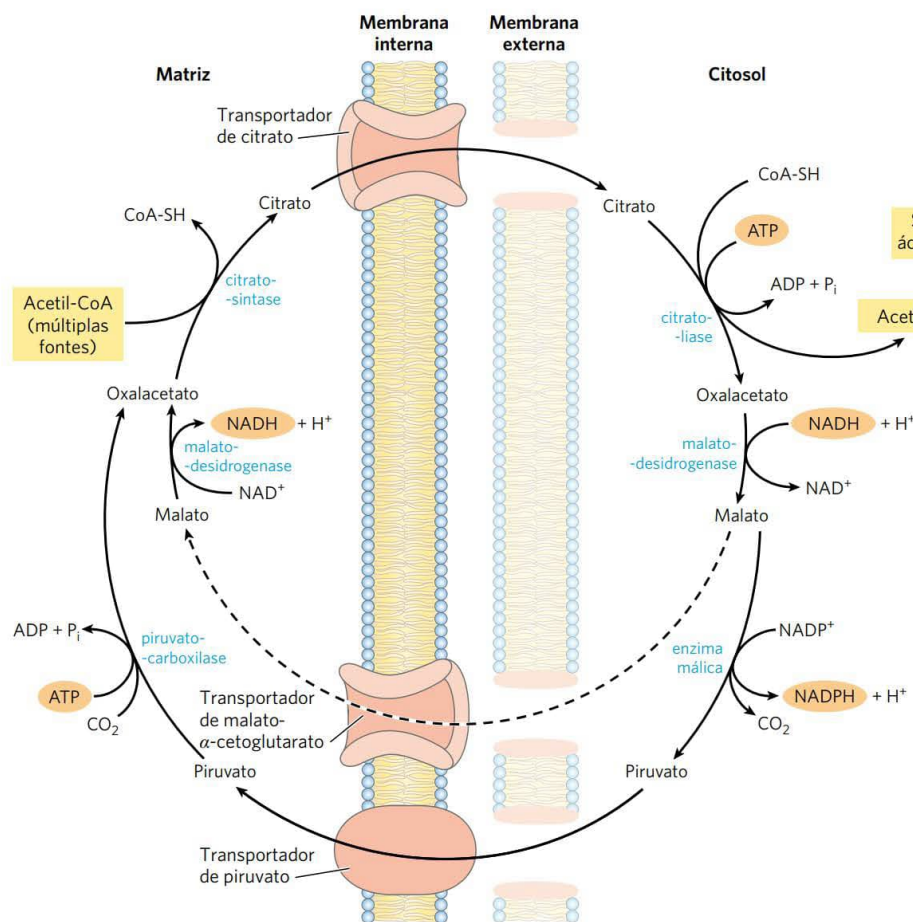
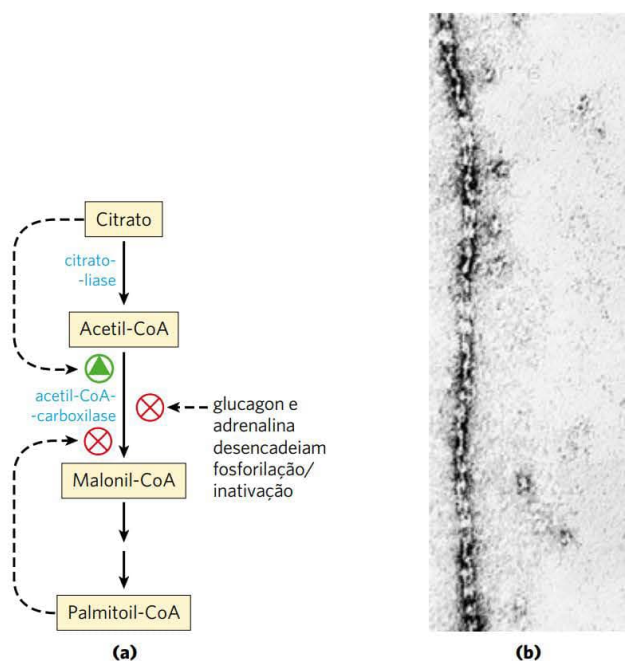


FIGURA 21-10 Lançadeira para a transferência de grupos acetila da mitocôndria para o citosol. A membrana mitocondrial externa é livremente permeável a todos esses compostos. O piruvato derivado do catabolismo dos aminoácidos na matriz mitocondrial ou da glicose por glicólise no citosol é convertido em acetil-CoA na matriz. Os grupos acetila saem da mitocôndria como citrato; no citosol, eles são liberados na forma de acetil-CoA para a síntese dos ácidos graxos. O oxalacetato é reduzido a malato, que pode retornar à matriz mitocondrial, onde é convertido em oxalacetato. O principal destino do malato citosólico, contudo, é a oxidação pela enzima málica, gerando NADPH citosólico; o piruvato produzido retorna à matriz mitocondrial.



-carboxilase. Ao mesmo tempo, o citrato inibe a atividade da fosfofrutocinase 1 (ver Figura 15-16), reduzindo o fluxo de carbono na glicólise.

A acetil-CoA-carboxilase também é regulada por modificação covalente. A fosforilação promovida pelas ações dos hormônios glucagon e adrenalina inativa a enzima e reduz sua sensibilidade à ativação por citrato, reduzindo, dessa forma, a velocidade da síntese de ácidos graxos. Na sua forma ativa (desfosforilada), a acetil-CoA-carboxilase polimeriza em longos filamentos (Figura 21-11b); a fosforilação é acompanhada pela dissociação das subunidades monoméricas e perda da atividade.

FIGURA 21-11 Regulação da síntese dos ácidos graxos. (a) Nas células de vertebrados, tanto a regulação alostérica como a modificação covalente dependente de hormônios influenciam o fluxo dos precursores para a formação de malonil-CoA. Nos vegetais, a acetil-CoA-carboxilase é ativada pelas variações na $[Mg^{2+}]$ e no pH que acompanham a iluminação (não mostradas aqui). (b) Filamentos da acetil-CoA-carboxilase de hepatócito de galinha (a forma ativa, desfosforilada) como vistos ao microscópio eletrônico. [Fonte: (b) cortesia de James M. Ntambi, PhD, Professor de Bioquímica e de Nutrição, Steenbock, University of Wisconsin-Madison.]

A acetil-CoA-carboxilase de plantas e bactérias não é regulada por citrato ou por um ciclo de fosforilação-desfosforilação. A enzima vegetal é ativada por um aumento do pH do estroma e da $[Mg^{2+}]$, que ocorre com a iluminação da planta (ver Figura 20-44). As bactérias não utilizam triacilgliceróis para armazenar energia. Em *E. coli*, a principal função da síntese de ácidos graxos é fornecer precursores para a síntese de lipídeos de membrana; a regulação desse processo é complexa, envolvendo nucleotídeos da guanina (como ppGpp) que coordenam o crescimento celular com a formação da membrana (ver Figuras 8-42 e 28-22).

Além da regulação momento a momento da atividade enzimática, essas vias são reguladas no nível da expressão gênica. Por exemplo, quando os animais ingerem um excesso de certos ácidos graxos poli-insaturados, a expressão de genes que codificam uma série de enzimas lipogênicas no fígado é suprimida. A regulação desses genes é mediada por uma família de receptores proteicos nucleares, chamados de PPAR, descritos em mais detalhes no Capítulo 23 (ver Figura 23-43).

Se a síntese de ácidos graxos e a β -oxidação ocorrem simultaneamente, os dois processos constituíram um ciclo desnecessário, desperdiçando energia. Já foi visto (ver Figura 17-13) que a β -oxidação é bloqueada por malonil-CoA, que inibe a enzima carnitina-aciltransferase I. Assim, durante a síntese de ácidos graxos, a produção do primeiro intermediário, a malonil-CoA, desliga a β -oxidação no nível do sistema transportador na membrana interna da mitocôndria. Esse mecanismo de controle ilustra outra vantagem da separação das vias sintéticas e degradativas em compartimentos celulares distintos.

Os ácidos graxos saturados de cadeia longa são sintetizados a partir do palmitato

O palmitato, produto principal do sistema do ácido graxo-sintase nas células animais, é o precursor de outros ácidos graxos de cadeia longa (Figura 21-12). Ele deve ser alongado, formando estearato (18:0) ou ácidos graxos saturados ainda maiores pela adição de grupos acetila, pela ação do **sistema de alongamento de ácidos graxos** presente no retículo endoplasmático (RE) liso e na mitocôndria. O sistema de alongamento mais ativo do RE alonga a cadeia de 16 carbonos da palmitoil-CoA em dois átomos de carbono, formando estearoil-CoA. Embora diferentes sistemas enzimáticos estejam envolvidos e a coenzima A seja o transportador de grupos acila, em lugar da ACP, o mecanismo de alongamento no RE é idêntico àquele utilizado na síntese do palmitato: doação de dois carbonos a partir da malonil-CoA, seguindo-se redução, desidratação e nova redução do produto saturado de 18 carbonos, a estearoil-CoA.

Dois produtos-chave das vias de alongamento são o linoleato, um ácido graxo ômega 6 (ver Capítulo 10 para nomenclatura alternativa), e o α -linolenato, um ácido graxo ômega 3. Esses são precursores de duas grandes famílias de derivados de ácidos graxos insaturados, as famílias ômega 6 e ômega 3. Os seres humanos não conseguem sintetizar linoleato e α -linolenato, de modo que devem obtê-los da dieta. A razão de ácidos graxos ômega 6 para ômega 3 na dieta,

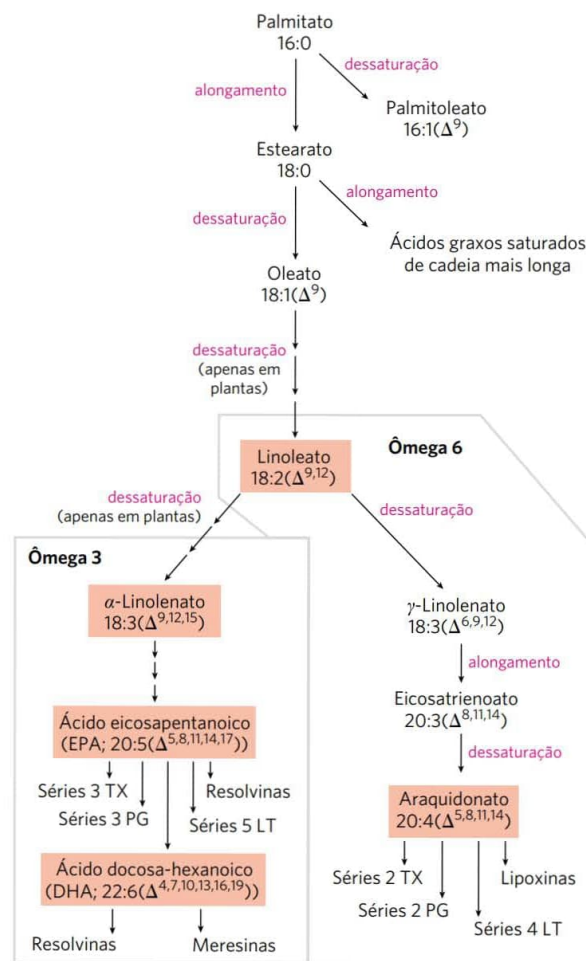


FIGURA 21-12 Vias de síntese de ácidos graxos insaturados e seus derivados. O palmitato é o precursor do estearato e dos ácidos graxos saturados de cadeias mais longas, assim como dos ácidos graxos monoinsaturados palmitoleato e oleato. Os mamíferos são incapazes de converter oleato em linoleato ou em α -linolenato (sombreado em cor salmão), que são, portanto, necessários na dieta como ácidos graxos essenciais. A conversão de linoleato em outros ácidos graxos poli-insaturados e em eicosanoides está representada nesta figura. Os ácidos graxos insaturados são simbolizados pela indicação do número de carbonos e do número e da posição de ligações duplas, como na Tabela 10-1. Linoleato e α -linolenato são importantes ácidos graxos ômega 6 e ômega 3, respectivamente; são também precursores para uma ampla variedade de ácidos graxos insaturados que atuam como moléculas sinalizadoras. Abreviações de duas letras especificam eicosanoides dos tipos prostaglandinas (PG), tromboxanos (TX) e leucotrienos (LT). Classes determinadas de ácidos graxos insaturados são ainda especificadas pelo número de ligações duplas, que define as subclasses desses compostos, referidas como séries. Por exemplo, compostos da série 2 TX são tromboxanos com duas ligações duplas na cadeia hidrocarbonada.

quando muito alta, pode levar a doenças cardiovasculares. A importância dessa razão pode refletir a multitude de moléculas sinalizadoras nas famílias ômega 6 e ômega 3 (Figura 21-12), com seus igualmente complexos efeitos fisiológicos. Alguns desses ácidos graxos insaturados derivados são considerados a seguir.

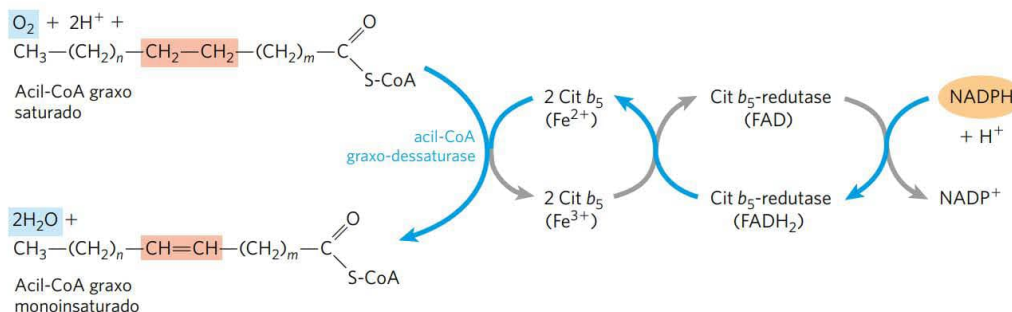



FIGURA 21-13 Transferência de elétrons no processo de dessaturação dos ácidos graxos em vertebrados. As setas azuis mostram o caminho dos elétrons à medida que dois substratos diferentes – acil-CoA graxo e NADPH – são oxidados pelo oxigênio molecular. Essas reações ocorrem na face luminal do RE liso. Uma via semelhante, mas com transportadores de elétrons diferentes, ocorre em vegetais.

A dessaturação dos ácidos graxos requer uma oxidase de função mista

O palmitato e o estearato servem como precursores dos dois ácidos graxos monoinsaturados mais comuns nos tecidos animais: o palmitoleato, 16:1(Δ^9) e o oleato, 18:1(Δ^9); os dois ácidos graxos contêm uma única ligação dupla *cis* entre C-9 e C-10 (ver Tabela 10-1). A ligação dupla é introduzida na cadeia do ácido graxo por uma reação oxidativa catalisada pela **acil-CoA-graxo-dessaturase** (Figura 21-13), uma **oxidase de função mista** (Quadro 21-1). Dois substratos diferentes, o ácido graxo e o NADPH, sofrem oxidação simultaneamente, perdendo dois elétrons. O caminho do fluxo dos elétrons inclui um citocromo (citocromo b_5) e uma flavoproteína (citocromo b_5 -redutase), ambos localizados no RE liso, assim como a acil-CoA graxo-dessaturase. Nos vegetais, o oleato é produzido por uma **estearoil-ACP-dessaturase** (EAD) que utiliza a ferredoxina reduzida como doadora de elétrons no estroma dos cloroplastos.

 A EAD de animais (estudada em camundongos) tem um papel importante no desenvolvimento da obesidade e da resistência à insulina, que, com frequência, acompanha a obesidade e precede o desenvolvimento de diabetes melito tipo 2. O camundongo tem quatro isoenzimas, EAD1 a EAD4, das quais EAD1 é a mais bem entendida. Sua síntese é induzida por ácidos graxos saturados da dieta e também pela ação de SREBP e RHX, dois reguladores proteicos do metabolismo de lipídeos que ativam a transcrição de enzimas envolvidas na síntese de lipídeos (descritos na Seção 21.4). Camundongos contendo formas mutantes da EAD1 são resistentes à obesidade induzida pela dieta e não desenvolvem diabetes em condições que causariam tanto obesidade quanto diabetes em camundongos portadores de EAD1 normal. ■

Os hepatócitos dos mamíferos podem facilmente introduzir ligações duplas na posição Δ^9 dos ácidos graxos, mas não podem introduzir ligações duplas adicionais entre C-10 e a extremidade metila. Assim, como foi observado acima, mamíferos não conseguem sintetizar o linoleato, 18:2($\Delta^{9,12}$), precursor da família ômega 6, ou o α -linolenato, 18:3($\Delta^{9,12,15}$), precursor da família ômega 3. No entanto, os vegetais podem sintetizar ambos; as dessaturases que introduzem ligações duplas nas posições Δ^{12} e Δ^{15} estão localizadas no RE e nos cloroplastos. As enzimas do RE não atuam sobre ácidos gra-

xos livres, mas sobre um fosfolipídeo, a fosfatidilcolina, que contém pelo menos um oleato ligado ao glicerol (Figura 21-14). Plantas e bactérias devem sintetizar os ácidos graxos poli-insaturados para garantir a fluidez da membrana em temperaturas reduzidas.

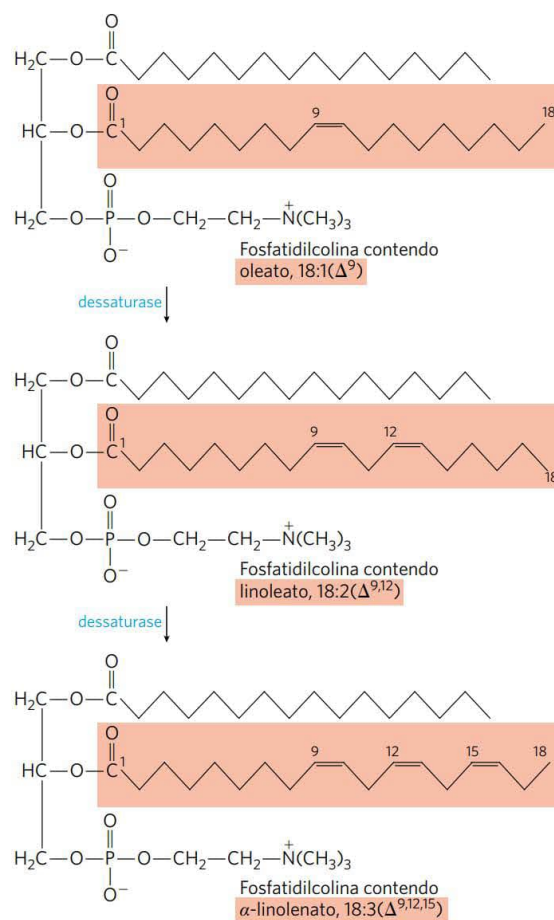


FIGURA 21-14 Ação das dessaturases de vegetais. Nas plantas, as dessaturases oxidam o oleato ligado à fosfatidilcolina, produzindo ácidos graxos poli-insaturados. Alguns dos produtos são liberados da fosfatidilcolina por hidrólise.

QUADRO 21-1



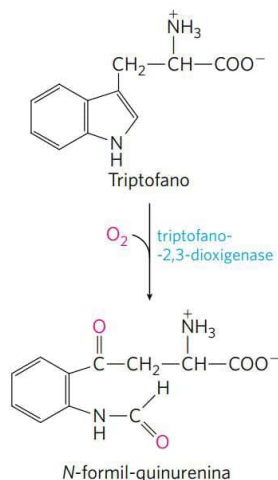
MEDICINA

Oxidases, oxigenases, enzimas citocromo P-450 e overdose de fármacos

Neste capítulo foram abordadas diversas enzimas que catalisam reações de oxidação-redução em que o oxigênio molecular é um participante. A estearoil-CoA-dessaturase (EAD) que introduz uma ligação dupla em uma cadeia acila longa (ver Figura 21-13) é uma dessas enzimas.

A nomenclatura das enzimas que catalisam as reações desse tipo frequentemente pode ser confusa para os estudantes. **Oxidase** é o nome geral para enzimas que catalisam oxidações em que o oxigênio molecular é o aceptor de elétrons; no entanto, os átomos de oxigênio não aparecem no produto oxidado. A enzima que introduz uma ligação dupla na acil-CoA graxa durante a oxidação dos ácidos graxos nos peroxissomos (ver Figura 17-14) é uma oxidase desse tipo; um segundo exemplo é a citocromo-oxidase da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (ver Figura 19-13). No primeiro caso, a transferência de dois elétrons para H_2O produz peróxido de hidrogênio, H_2O_2 ; no segundo, dois elétrons reduzem $\frac{1}{2}O_2$ a H_2O . Muitas oxidases são flavoproteínas, mas não todas elas. **Oxidases de função mista** oxidam dois substratos distintos de modo simultâneo; novamente, os átomos de oxigênio molecular não aparecem nos produtos oxidados. Oxidases de função mista atuam na dessaturação de ácidos graxos (acil-CoA-dessaturase; ver Figura 21-13) e na última etapa da síntese de plasmalogênios (ver Figura 21-30).

As **oxigenases** catalisam reações oxidativas em que átomos de oxigênio são diretamente incorporados na molécula do produto, formando um novo grupo hidroxila ou carboxila, por exemplo. As **dioxigenases** catalisam reações em que os dois átomos de oxigênio do O_2 são incorporados na molécula do produto orgânico. Um exemplo de dioxigenase é a triptofano-2,3-dioxigenase, que catalisa a abertura do anel de cinco membros do triptofano no catabolismo desse aminoácido. Quando essa reação ocorre na presença de $^{18}O_2$, os átomos de oxigênio isotópicos são encontrados nos dois grupos carbonila do produto (mostrado em vermelho):



As **monoxigenases**, mais comuns e mais complexas em suas ações, catalisam reações em que apenas um dos dois átomos de oxigênio do O_2 é incorporado no produto orgânico, o outro sendo reduzido a H_2O ; um exemplo é a esqualeno monoxigenase (ver Figura 21-37). As monoxigenases necessitam de dois substratos para funcionarem como redutores dos dois átomos de oxigênio do O_2 . O substrato principal aceita um dos dois átomos de oxigênio e um cossubstrato fornece átomos de hidrogênio para reduzir o outro átomo de oxigênio a H_2O . A equação geral da reação para as monoxigenases é



em que AH é o substrato principal e BH_2 é o cossubstrato. Como a maioria das monoxigenases catalisa reações em que o substrato principal se torna hidroxilado, elas também são chamadas de **hidroxilases**. Algumas vezes também são chamadas de **oxigenases de função mista**, para indicar que oxidam dois substratos diferentes simultaneamente.

Existem diferentes classes de monoxigenases, dependendo da natureza do cossubstrato. Algumas utilizam os nucleotídeos de flavina ($FMNH_2$ ou $FADH_2$); outras usam NADH ou NADPH; e há as que utilizam o α -cetoglutarato como cossubstrato. A enzima que hidroxila o anel de fenila da fenilalanina, formando tirosina, é uma monoxigenase que utiliza tetra-hidrobipterina como cossubstrato (ver Figura 18-23). (Essa é a enzima defeituosa na doença genética humana chamada de fenilcetonúria.)

As mais numerosas e mais complexas reações de monoxigenação são aquelas que usam um tipo de hemoproteína, chamada de **citocromo P-450**. Da mesma forma que a citocromo-oxidase mitocondrial, enzimas contendo um domínio citocromo P-450 podem reagir com O_2 e ligar monóxido de carbono, mas elas podem ser diferenciadas da citocromo-oxidase por medidas de absorbância, já que o complexo das suas formas reduzidas com o monóxido de carbono exibe intensa absorção de luz a 450 nm – por isso o nome P-450.

As enzimas citocromo P-450 catalisam reações de hidroxilação em que um substrato orgânico, RH, é hidroxilado a R-OH, incorporando um átomo de oxigênio do O_2 ; o outro átomo de oxigênio é reduzido a H_2O pelos equivalentes redutores fornecidos pelo NADH ou pelo NADPH, mas que geralmente são transferidos para o citocromo P-450 por uma proteína ferro-enxofre. A Figura Q-1 mostra um esquema simplificado da ação do citocromo P-450.

Existe uma grande família de proteínas contendo P-450 de dois tipos gerais: aquelas altamente específicas para um único substrato (como as enzimas típicas) e aquelas com sítios de ligação mais promíscuos que aceitam uma variedade de substratos, geralmente se-

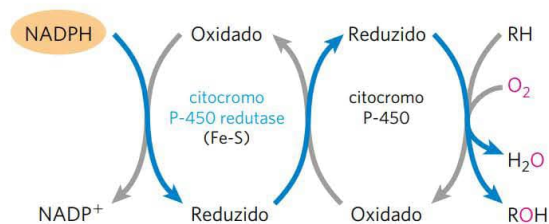


FIGURA Q-1 Ciclo de reação simplificado para o citocromo P-450.

melhantes na hidrofobicidade. No córtex da glândula suprarrenal, por exemplo, um citocromo P-450 específico participa da hidroxilação de esteroides, gerando os hormônios adrenocorticais (ver Figura 21-49). Existem dúzias de enzimas contendo P-450 que atuam sobre substratos específicos nas vias biossintéticas dos hormônios esteroides e dos eicosanoides. As enzimas citocromo P-450 com especificidades mais amplas são importantes na hidroxilação de muitos fármacos distintos, como barbitúricos e outros xenobióticos (substâncias estranhas ao organismo), particularmente se são hidrofóbicos e relativamente insolúveis. O carcinógeno ambiental benzo[*a*]pireno (encontrado na fumaça do cigarro) sofre hidroxilação dependente do citocromo P-450 durante sua destoxificação. A hidroxilação de xenobióticos, algumas vezes combinada com o acoplamento de um composto polar, como o ácido glicurônico, a um grupo hidroxila, torna-os mais solúveis em água

e permite a sua excreção na urina. A hidroxilação (e a glicuronidação) inativa a maioria dos fármacos, e a velocidade com que isso ocorre determina por quanto tempo uma determinada dose de um medicamento permanece no sangue em doses terapêuticas.

Os seres humanos diferem em seus níveis de enzimas de metabolização de fármacos por dois motivos: pela sua genética e pelo fato de que a exposição prévia a substratos pode induzir a síntese de níveis maiores das enzimas P-450. O etanol e os barbitúricos compartilham uma enzima P-450. O consumo excessivo de álcool por longo prazo induz a síntese dessa enzima P-450. Como barbitúricos são inativados e eliminados mais rápido, são necessárias doses maiores do fármaco para alcançar o mesmo efeito terapêutico. Se um indivíduo ingerir essa dose de barbitúrico maior que o comum e também ingerir álcool, a competição entre o álcool e o fármaco pela quantidade limitada de enzima significa que tanto o álcool como o barbiturato serão eliminados mais lentamente. Os altos níveis resultantes desses dois depressores do sistema nervoso central podem ser letais. Complicações semelhantes surgem quando um indivíduo ingere dois fármacos que são inativados pela mesma enzima P-450; cada fármaco aumenta os níveis do outro por reduzir sua inativação. Em consequência disso, é essencial para médicos e farmacêuticos saber acerca de todos os medicamentos e suplementos prescritos ou dos quais o paciente faz uso (assim como conhecer o histórico de alcoolismo, tabagismo ou exposição a toxinas ambientais).

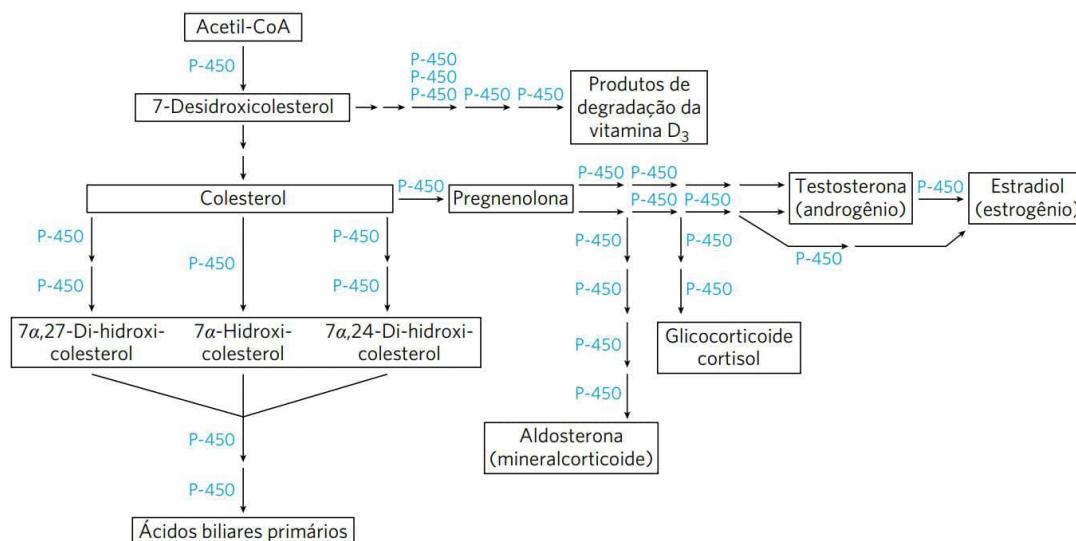


FIGURA Q-2 Vias de biossíntese de esteróides, mostrando as etapas onde atuam enzimas citocromo P-450.

Como eles são precursores necessários para a síntese de outros produtos, o linoleato e o α -linolenato são **ácidos graxos essenciais** para os mamíferos; eles devem ser obtidos dos vegetais presentes na dieta. Uma vez ingerido, o linoleato pode ser convertido em alguns outros ácidos poli-insaturados, principalmente γ -linolenato, eicosatrienoato e **araquidonato (eicosatetraenoato)**, e todos eles podem ser formados apenas a partir do linoleato (Figura 21-12). Do mesmo modo, o α -linolenato é convertido em dois importantes derivados, o **ácido eicosapentaenoico (EPA)** e o **ácido docosa-hexaenoico (DHA)**. Araquidonato, 20:4($\Delta^{5,8,11,14}$), EPA, 20:5($\Delta^{5,8,11,14,17}$), e DHA, 22:6($\Delta^{4,7,10,13,16,19}$), são precursores essenciais de classes distintas de eicosanoides (Figura 21-12), lipídeos com importantes funções regulatórias. Os ácidos graxos de 20 e 22 carbonos são sintetizados a partir do linoleato (e α -linolenato) por reações de alongamento de ácidos graxos análogas àquelas descritas na página 820.

Os eicosanoides são formados a partir de ácidos graxos poli-insaturados de 20 ou 22 carbonos

Os eicosanoides são uma família de moléculas de sinalização biológica muito potentes, que atuam como mensageiros de curta distância, agindo sobre os tecidos próximos às células que os produzem.

Em resposta a hormônios ou a outro estímulo, a fosfolipase A_2 , presente na maioria dos tipos de células de mamíferos, ataca fosfolipídeos de membrana, liberando araquidonato do carbono do meio do glicerol. As enzimas do RE liso, então, convertem o araquidonato em **prostaglandinas**, iniciando com a formação de prostaglandina H_2 (PGH_2), o precursor imediato de muitas outras prostaglandinas e de tromboxanos (Figura 21-15a). As duas reações que levam à PGH_2 são catalisadas por uma enzima bifuncional, a **ciclooxigenase (COX)**, também chamada de **prostaglandina H_2 -sintase**. Na primeira das duas etapas, a atividade de ciclooxigenase introduz oxigênio molecular convertendo araquidonato em PGG_2 . A segunda etapa, catalisada pela atividade de peroxidase da COX, converte PGG_2 em PGH_2 .

>> Convenção-chave: prostaglandinas com distintos grupos funcionais no anel recebem diferentes designações com letras: A, B, C, D, E, F, G, H e R. O número subscrito que se segue à letra indica o número de ligações duplas; por exemplo, PGH_2 e PGG_2 . As prostaglandinas com duas ligações duplas, todas elas derivadas do araquidonato, são referidas como prostaglandinas da série 2; aquelas com três ligações duplas, derivadas do EPA, como série 3 (Figura 21-12). Padrões similares de nomenclatura são usados para outras classes de eicosanoides, descritos a seguir. <<

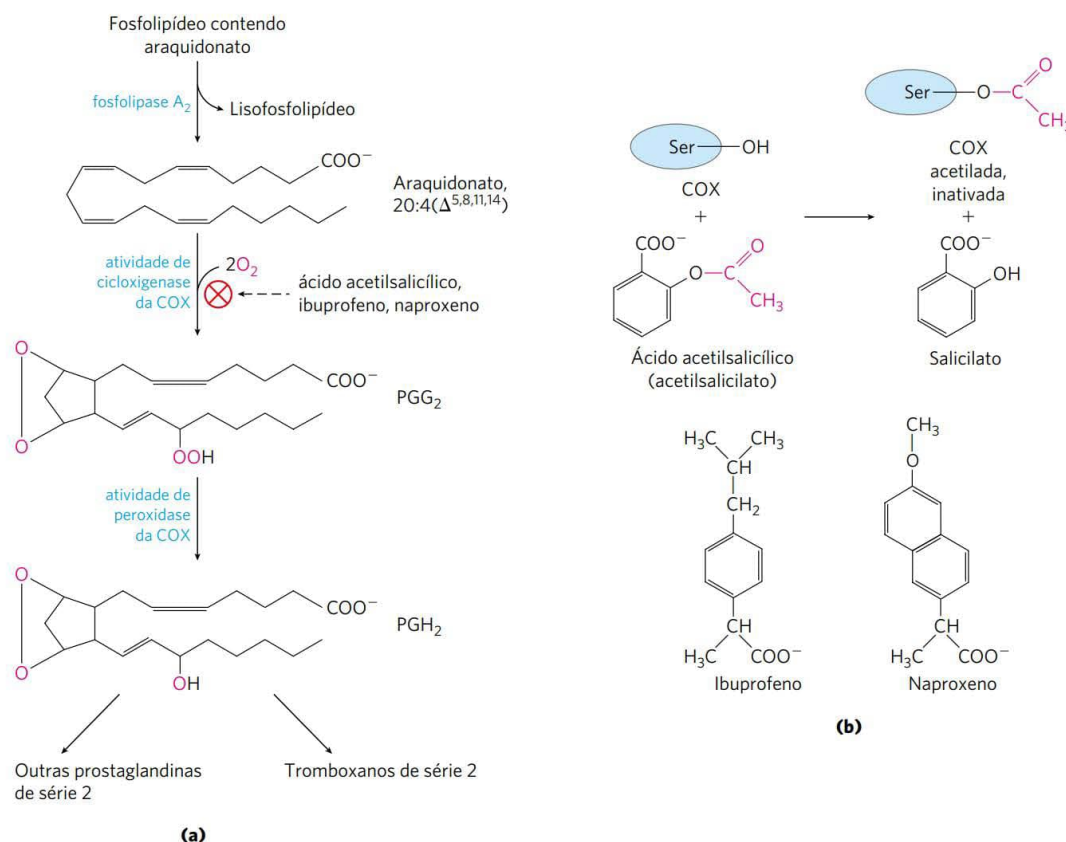


FIGURA 21-15 A via “cíclica” do araquidonato até prostaglandinas e tromboxanos. **(a)** Após a liberação do araquidonato dos fosfolipídeos pela ação da enzima fosfolipase A_2 , as atividades de ciclooxigenase e peroxidase da COX (também chamada de prostaglandina H_2 -sintase) catalisam a produção de PGH_2 , o precursor de outras prostaglandinas e tromboxanos. **(b)** O ácido acetilsalicílico inibe a primeira reação da via por acetilação de um resíduo de Ser essencial na enzima. O ibuprofeno e o naproxeno inibem a mesma etapa, provavelmente por mimetizarem a estrutura do substrato ou de um intermediário da reação.

As prostaglandinas da série 2 têm papéis importantes na resposta imediata ao estresse ou a lesões, incluindo inflamação, dor, edema e dilatação dos vasos. As prostaglandinas da série 3, em geral, atuam mais lentamente e muitas vezes diminuem as respostas associadas com prostaglandinas da série 2.

Os mamíferos têm duas isoenzimas da prostaglandina H_2 -sintase, a COX-1 e a COX-2. Elas têm funções distintas, mas as sequências de aminoácidos são muito semelhantes (60 a 65% de identidade de sequência) e mecanismos de reação similares nos seus dois centros catalíticos. A COX-1 é responsável pela síntese das prostaglandinas que regulam a secreção da mucina gástrica, e a COX-2 pelas prostaglandinas que controlam inflamação, dor e febre.



A dor pode ser aliviada pela inibição da COX-2. O primeiro fármaco amplamente comercializado com esse propósito foi o ácido acetilsalicílico (acetilsalicilato; Figura 21-15b). O nome “aspirina” (*a* de acetil e *spir* de *Spiraea*, a palavra alemã para os salicilatos preparados a partir da planta *Spiraea ulmaria*) apareceu em 1899 quando o fármaco foi introduzido no mercado pela companhia Bayer. O ácido acetilsalicílico inativa irreversivelmente a atividade de cicloxigenase das duas isoenzimas da COX, por acetilar um resíduo de Ser, bloqueando os sítios ativos dessas enzimas. Como consequência, a síntese de prostaglandinas e tromboxanos é inibida. O ibuprofeno, outro fármaco anti-inflamatório não esteroide (AINE; Figura 21-15b) amplamente utilizado, inibe o mesmo par de enzimas. No entanto, a inibição da COX-1 pode resultar em efeitos colaterais indesejáveis, como irritação estomacal e condições ainda mais sérias. Na década de 1990, foram desenvolvidos compostos AINE com maior especificidade para a COX-2, para uso em terapias avançadas de dores graves. Três desses fármacos foram aprovados para uso em todo o mundo: rofecoxibe (Vioxx), valdecoxibe (Bextra) e celecoxibe (Celebrex). No entanto, embora inicialmente considerados um sucesso, Vioxx e Bextra foram retirados do mercado quando estudos de campo e estudos clínicos ligaram o uso dos fármacos ao aumento no risco de infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral. O Celebrex ainda está no mercado, mas está sendo usado com cuidado aumentado. As razões detalhadas para os problemas com esses fármacos ainda não estão claras. Contudo, estudos continuam a revelar novos eicosanoides sinalizadores e novos modos de ação. Os problemas com inibidores avançados de COX-2 servem

como um aviso de cautela. Estamos cada vez mais cientes da complexidade da rede dessas interações entre sinalizadores, e prever as consequências de se tomar como alvo de agentes farmacêuticos alguns componentes específicos dessas redes continua a ser um processo imperfeito.

A **tromboxano-sintase**, presente nas plaquetas sanguíneas (trombócitos), converte PGH_2 em tromboxano A_2 , do qual outros **tromboxanos** da série 2 são derivados (Figura 21-15a). Os tromboxanos da série 2 induzem a constrição dos vasos sanguíneos e a agregação plaquetária, etapas iniciais na coagulação sanguínea. Baixas doses de ácido acetilsalicílico ingeridas regularmente reduzem a probabilidade de infartos do miocárdio e de acidentes vasculares cerebrais pela redução da produção de tromboxanos. ■

Os tromboxanos, assim como as prostaglandinas, contêm um anel de cinco ou seis átomos; a via a partir do araquidonato que leva a essas duas classes de compostos da série 2 é, algumas vezes, chamada de via “cíclica”, para distingui-la da via linear que leva do araquidonato aos **leucotrienos**, que são compostos lineares (Figura 21-16). A síntese dos leucotrienos inicia com a ação de diversas lipoxigenases que catalisam a incorporação do oxigênio molecular ao araquidonato. Essas enzimas, encontradas em leucócitos, no coração, no encéfalo, nos pulmões e no baço, são oxidases de função mista da família do citocromo P-450 (ver Quadro 21-1). Os diversos leucotrienos diferem na posição do grupo peróxido introduzido pelas lipoxigenases. A via linear a partir do araquidonato, ao contrário da via cíclica, não é inibida pelo ácido acetilsalicílico ou outros compostos AINE.



Organismos patogênicos, assim como agentes irritantes, como alguns poluentes do ar e fumaça de tabaco, disparam uma resposta inflamatória no tecido afetado, que consiste em duas fases: início e resolução (retorno ao estado normal). Eicosanoides e lipídeos da família ômega 6 são fundamentais para a fase inicial – desempenhando papéis-chave no recrutamento de leucócitos, tornando os vasos sanguíneos mais permeáveis e estimulando a quimiotaxia e a migração de células do sistema imune. À medida que a fonte da lesão tecidual é controlada, a inflamação deve diminuir e o tecido volta a seu estado normal. A redução da inflamação é promovida por diversas classes de moléculas sinalizadoras; entre elas, diversos leucotrienos e prostaglandinas são especialmente proeminentes. Muitos eicosanoides da família ômega 3 (incluindo prostaglandinas

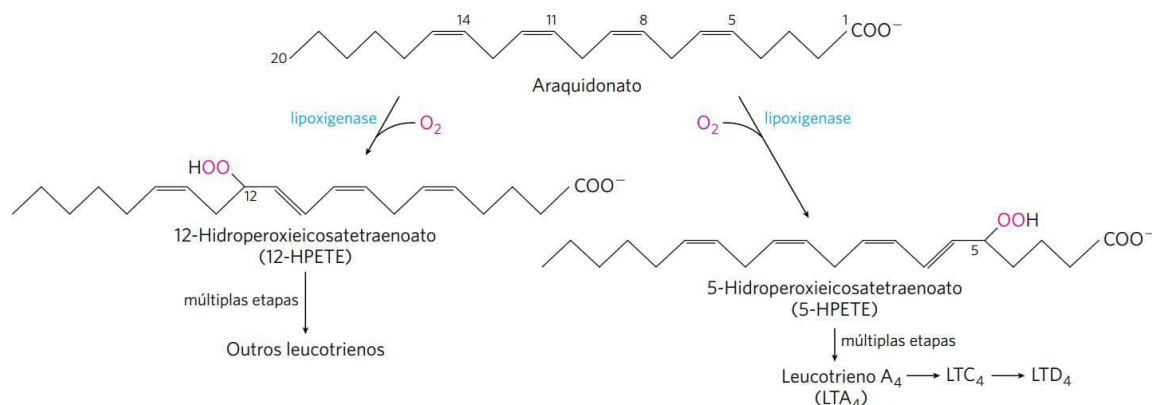


FIGURA 21-16 A via “linear” do araquidonato até os leucotrienos.

e tromboxanos da série 3) são anti-inflamatórios, embora a classificação não seja absoluta; eicosanoides individuais podem ser inflamatórios em um tecido e anti-inflamatórios em outro. Na fase de resolução também é utilizado um conjunto de eicosanoides recém-descobertos, denominados **mediadores especializados pró-resolução (SPM)**. A primeira família desses mediadores a ser descoberta foram as **lipoxinas**, seguindo-se mais recentemente as resolvinas, as protectinas e as maresinas. Todos os SPM são derivados de ácidos graxos essenciais (Figura 21-12). Eles afetam distintos alvos celulares e teciduais de diferentes modos. A soma de suas ações promove a remoção de restos celulares, bactérias e células mortas, para restaurar a integridade dos vasos sanguíneos e para regenerar os tecidos. Os SPM também reduzem dor e febre e, desse modo, são de grande interesse como alvos farmacêuticos. ■

Os vegetais também produzem importantes moléculas de sinalização a partir dos ácidos graxos. Como nos animais, uma etapa-chave na iniciação da sinalização envolve a ativação de uma fosfolipase específica. Em plantas, o ácido graxo liberado pela ação da fosfolipase é o α -linolenato. Uma lipoxigenase catalisa, então, a primeira etapa de uma via que converte α -linolenato em jasmonato, uma substância conhecida por ter função sinalizadora na defesa contra insetos, na resistência a patógenos fúngicos e na maturação do pólen. O jasmonato também interfere na germinação das sementes, no crescimento das raízes e no desenvolvimento dos frutos e das sementes.

RESUMO 21.1 Biossíntese de ácidos graxos e eicosanoides

- Os ácidos graxos saturados de cadeia longa são sintetizados a partir de acetil-CoA por um sistema citosólico de seis atividades enzimáticas e uma proteína transportadora de grupos acila (ACP). Existem dois tipos de ácido graxo-sintases (AGS). A AGS I, encontrada em vertebrados e fungos, consiste em polipeptídeos multifuncionais. A AGS II é um sistema dissociado, encontrado em bactérias e plantas. Ambas contêm dois tipos de grupos —SH (um fornecido pela fosfopanteteína da ACP, o outro por um resíduo de Cys da β -cetoacil-ACP-sintase) que funcionam como transportadores de intermediários acil graxo.
- Malonil-ACP, formada a partir de acetil-CoA (transportada para fora da mitocôndria) e CO_2 , condensa-se com o grupo acetila ligado ao —SH da Cys, gerando acetacetil-ACP, com a liberação de CO_2 . Esta etapa é seguida por redução ao derivado D- β -hidroxiacila, desidratação a *trans*- Δ^2 -acil-ACP insaturada e redução a butiril-ACP. NADPH é o doador de elétrons para ambas as reduções. A síntese dos ácidos graxos é regulada na etapa de formação de malonil-CoA.
- Mais seis moléculas de malonil-ACP reagem sucessivamente na extremidade carboxila da cadeia do ácido graxo em crescimento, formando palmitoil-ACP – o produto final da reação da ácido graxo-sintase. O palmitato livre é liberado por hidrólise.
- O palmitato pode ser alongado a estearato, com 18 carbonos. Palmitato e estearato podem ser dessaturados, gerando palmitoleato e oleato, respectivamente, pela ação de oxidases de função mista.

- Os mamíferos não podem sintetizar linoleato e devem obtê-lo a partir de fontes vegetais; eles convertem o linoleato exógeno em araquidonato, o composto precursor dos eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e mediadores especializados pró-resolução), uma família de moléculas de sinalização muito potentes. A síntese das prostaglandinas e dos tromboxanos é inibida pelos AINE que atuam sobre a atividade de ciclooxigenase da prostaglandina H_2 -sintase.

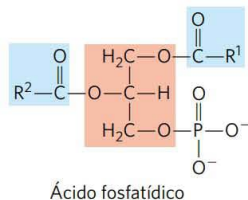
21.2 Biossíntese de triacilgliceróis

A maior parte dos ácidos graxos sintetizados ou ingeridos por um organismo possui um de dois destinos: a incorporação em triacilgliceróis para o armazenamento de energia metabólica ou a incorporação nos componentes fosfolipídicos da membrana. A divisão entre esses destinos alternativos depende das necessidades momentâneas do organismo. Durante o crescimento rápido, a síntese de novas membranas requer a produção de fosfolípidos de membrana; quando um organismo dispõe de suprimento abundante de alimento, mas não está crescendo ativamente, ele desvia a maior parte dos ácidos graxos para a síntese das gorduras de reserva. As duas vias iniciam no mesmo ponto: a formação de ésteres de acila com o glicerol. Esta seção estuda a formação de triacilgliceróis e a sua regulação, bem como a produção de glicerol-3-fosfato no processo de gliceroneogênese.

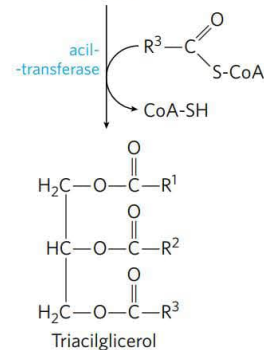
Os triacilgliceróis e os glicerofosfolípidos são sintetizados a partir dos mesmos precursores

Os animais são capazes de sintetizar e estocar grandes quantidades de triacilgliceróis para serem utilizados posteriormente como combustível (ver Quadro 17-1). Os seres humanos estocam apenas poucas centenas de gramas de glicogênio no fígado e nos músculos, quantidade suficiente apenas para suprir as necessidades energéticas do corpo por 12 horas. Em contrapartida, a quantidade total de triacilglicerol armazenado em um homem de 70 kg de constituição média é de cerca de 15 kg, o suficiente para suprir as necessidades energéticas basais por aproximadamente 12 semanas (ver Tabela 23-6). Os triacilgliceróis apresentam o maior conteúdo energético entre todos os nutrientes estocados – mais de 38 kJ/g. Sempre que os carboidratos são ingeridos em excesso à capacidade de armazenamento de glicogênio, esse excesso é convertido em triacilgliceróis e armazenado no tecido adiposo. Os vegetais também sintetizam triacilgliceróis como combustível rico em energia e eles são armazenados, sobretudo, nos frutos, nas nozes e nas sementes.

Nos tecidos animais, os triacilgliceróis e os glicerofosfolípidos, como a fosfatidiletanolamina, compartilham dois precursores (acil-CoA graxo e L-glicerol-3-fosfato) e diversas etapas biossintéticas. A grande maioria do glicerol-3-fosfato é derivada do intermediário glicolítico di-hidroxiacetona-fosfato (DHAP) pela ação da **glicerol-3-fosfato-desidrogenase** citosólica ligada ao NAD; no fígado e nos rins, uma pequena parte do glicerol-3-fosfato também é produzida a partir do glicerol pela ação da **glicerol-cinase** (Figura 21-17). Os outros precursores dos triacilgliceróis são acil-CoA graxos, formadas a partir dos ácidos graxos pelas **acil-CoA-sintetases**, as mesmas enzimas responsáveis pela ativação dos ácidos graxos para a β -oxidação (ver Figura 17-5).




A primeira etapa na biossíntese dos triacilgliceróis é a acilação dos dois grupos hidroxila livres do L-glicerol-3-fosfato, por duas moléculas de acil-CoA graxo, gerando **diacilglicerol-3-fosfato**, mais comumente chamado de **ácido**



fosfatídico ou fosfatidato (Figura 21-17). O ácido fosfatídico está presente apenas em quantidades muito pequenas na célula, mas é um intermediário central na biossíntese dos lipídeos; ele pode ser convertido tanto em um triacilglicerol quanto em um glicerofosfolipídeo. Na via de síntese de triacilgliceróis, o ácido fosfatídico é hidrolisado pelo **ácido fosfatídico fosfatase** (também chamado de lipina), formando 1,2-diacylglicerol (Figura 21-18). Os diacylgliceróis são, então, convertidos em triacylgliceróis por transesterificação com um terceiro acil-CoA graxo.

Em seres humanos, a quantidade de gordura corporal permanece relativamente constante por longos períodos, embora possam ocorrer pequenas variações em curto espaço de tempo, à medida que a ingestão calórica flutua. Carboidratos, gorduras ou proteínas ingeridos em excesso à necessidade energética são armazenados na forma de triacilgliceróis, os quais podem ser mobilizados para o fornecimento de energia, capacitando o organismo a suportar períodos de jejum.

 A biossíntese e a degradação dos triacilgliceróis são reguladas de modo que a via favorecida depende das fontes metabólicas e das necessidades a um dado mo-

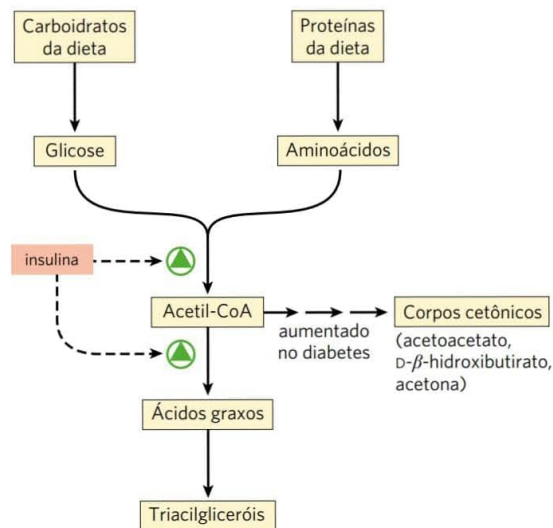


FIGURA 21-19 Regulação da síntese de triacilgliceróis pela insulina. A insulina estimula a conversão dos carboidratos e das proteínas da dieta em gordura. As pessoas com diabetes melito não apresentam insulina ou são insensíveis a ela. Isso resulta em diminuição da síntese de ácidos graxos, e a acetil-CoA proveniente do catabolismo dos carboidratos e das proteínas é desviada para a produção de corpos cetônicos. Pessoas com cetose grave exalam cheiro de acetona, de modo que essa condição é, às vezes, confundida com embriaguez (p. 938).

mento. A velocidade da biossíntese dos triacilgliceróis é profundamente alterada pela ação de diversos hormônios. A insulina, por exemplo, promove a conversão de carboidratos em triacilgliceróis (Figura 21-19). Pessoas com diabetes melito grave devido à falha na secreção ou na ação da insulina, além de não serem capazes de utilizar glicose de modo apropriado, falham também em sintetizar ácidos graxos a partir de carboidratos ou aminoácidos. Se o diabetes não é tratado, essas pessoas apresentam velocidade aumentada na oxidação de gorduras e na formação de corpos cetônicos (Capítulo 17) e, assim, perdem peso. ■

Um fator adicional no balanço entre biossíntese e degradação de triacilgliceróis é que cerca de 75% de todos os ácidos graxos liberados pela lipólise são reesterificados, formando triacilgliceróis, em vez de serem utilizados como combustível. Essa relação persiste mesmo em condições de jejum, quando o metabolismo energético é desviado da utilização de carboidratos para a oxidação de ácidos graxos. Parte dessa reciclagem dos ácidos graxos acontece no tecido adiposo, com a reesterificação ocorrendo antes da liberação na corrente sanguínea; parte ocorre em um ciclo sistêmico, pelo qual os ácidos graxos livres são transportados ao fígado, reciclados em triacilgliceróis, exportados mais uma vez para o sangue (o transporte de lipídeos no sangue é discutido na Seção 21.4) e captados novamente pelo tecido adiposo após sua liberação a partir dos triacilgliceróis pela lipase lipoproteica extracelular (Figura 21-20; ver também Figura 17-1). O fluxo por esse **ciclo dos triacilgliceróis**, entre o tecido adiposo e o fígado, pode ser bastante lento quando outros combustíveis estão disponíveis e a liberação dos ácidos graxos do tecido adiposo é limitada, mas, como descrito anteriormente, a proporção de ácidos graxos liberados que são reesterificados permanece mais ou menos

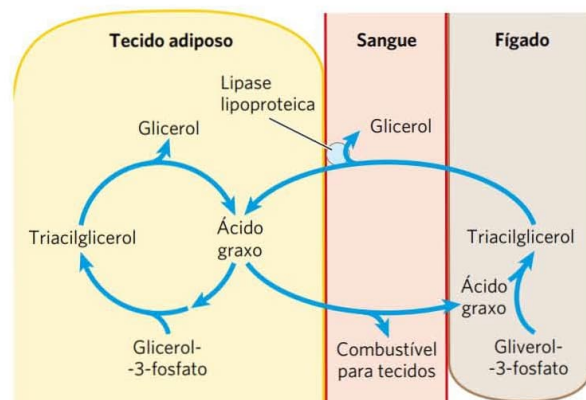


FIGURA 21-20 O ciclo do triacilglicerol. Em mamíferos, as moléculas de triacilglicerol são degradadas e resintetizadas em um ciclo do triacilglicerol durante o jejum. Parte dos ácidos graxos liberados pela lipólise dos triacilgliceróis no tecido adiposo passa para a corrente sanguínea e o restante é utilizado para resintetizar triacilglicerol. Parte dos ácidos graxos liberados no sangue é utilizada para fornecer energia (p. ex., no músculo), e parte é captada pelo fígado e utilizada para a síntese de triacilglicerol. O triacilglicerol formado no fígado é transportado pelo sangue de volta ao tecido adiposo, onde os ácidos graxos são liberados pela lipase lipoproteica extracelular, captados pelos adipócitos e reesterificados em triacilgliceróis.

constante em cerca de 75% em todas as condições metabólicas. Assim, o nível de ácidos graxos livres no sangue reflete tanto a velocidade de liberação dos ácidos graxos quanto o balanço entre a síntese e a degradação dos triacilgliceróis no tecido adiposo e no fígado.

Quando a mobilização dos ácidos graxos é necessária para satisfazer as necessidades energéticas, sua liberação do tecido adiposo é estimulada pelos hormônios glucagon e adrenalina (ver Figuras 17-3 e 17-13). De modo simultâneo, esses sinais hormonais diminuem a velocidade da glicólise e aumentam a velocidade da gliconeogênese no fígado (provendo glicose para o cérebro, como descrito de forma mais elaborada no Capítulo 23). Os ácidos graxos liberados são captados por diversos tecidos, incluindo os músculos, onde eles são oxidados para a geração de energia. A maior parte do ácido graxo captado pelo fígado não é oxidada, mas sim reciclada a triacilglicerol e retorna ao tecido adiposo.

A função desse ciclo aparentemente fútil dos triacilgliceróis (ciclos “fúteis” de substratos são discutidos no Capítulo 15) não está bem compreendida, porém, à medida que aprendemos mais acerca de como o ciclo é mantido via metabolismo em dois órgãos diferentes e como é regulado de forma coordenada, algumas possibilidades emergem. Por exemplo, o excesso da capacidade do ciclo do triacilglicerol (o ácido graxo reconvertido a triacilglicerol, e não oxidado como combustível) poderia representar uma reserva de energia na corrente sanguínea durante o jejum, a qual seria mais rapidamente mobilizada em uma emergência do tipo “luta ou fuga” do que a mobilização da energia armazenada na forma de triacilglicerol.

A reciclagem constante dos triacilgliceróis no tecido adiposo, mesmo durante o jejum, faz surgir uma segunda pergunta: qual é a fonte do glicerol-3-fosfato necessário para esse processo? Como observado acima, a glicólise é suprimi-

da nessas condições pela ação do glucagon e da adrenalina, de modo que pouca DHAP está disponível. Por sua vez, o glicerol liberado durante a lipólise não pode ser convertido diretamente em glicerol-3-fosfato no tecido adiposo, que não dispõe de glicerol-cinase (Figura 21-17). Assim, como é produzida uma quantidade suficiente de glicerol-3-fosfato? A resposta está em uma via descoberta há mais de três décadas, mas que recebeu pouca atenção até recentemente, uma via intimamente ligada ao ciclo do triacilglicerol e, em sentido mais amplo, ao balanço entre o metabolismo dos ácidos graxos e dos carboidratos.

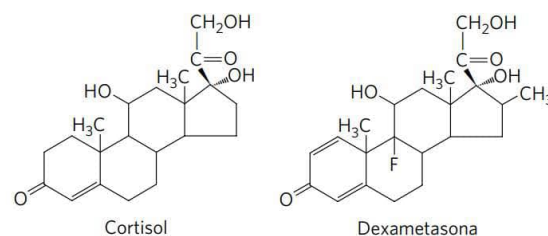
O tecido adiposo gera glicerol-3-fosfato por meio da gliceroneogênese

A **gliceroneogênese** é uma versão mais curta da gliconeogênese, partindo de piruvato a DHAP (ver Figura 14-17), seguindo-se a conversão de DHAP em glicerol-3-fosfato pela enzima citosólica glicerol-3-fosfato-desidrogenase ligada ao NAD (Figura 21-21). Depois, o glicerol-3-fosfato é utilizado na síntese de triacilglicerol. A gliceroneogênese foi descoberta na década de 1960 por Lea Reshef, Richard Hanson e John Ballard e, simultaneamente, por Eleazar Shafir e colaboradores, que estavam intrigados com a presença de duas enzimas gliconeogênicas, a piruvato-carboxilase e a fosfoenolpiruvato-carboxicinase (PEP), no tecido adiposo, onde a glicose não é sintetizada. Após um longo período de desatenção, o interesse por essa via foi renovado pela demonstração de uma ligação entre a gliceroneogênese e o diabetes tipo 2, como será visto.

A gliceroneogênese desempenha múltiplas funções. No tecido adiposo, a gliceroneogênese, acoplada à reesterificação dos ácidos graxos livres, controla a velocidade de

liberação dos ácidos graxos no sangue. No tecido adiposo marrom, a mesma via pode controlar a velocidade pela qual os ácidos graxos livres são enviados para a mitocôndria para utilização na termogênese. Nos seres humanos em jejum, a gliceroneogênese no fígado, sozinha, responde pela síntese de glicerol-3-fosfato suficiente para a reesterificação de até 65% dos ácidos graxos em triacilglicerol.

O fluxo pelo ciclo do triacilglicerol entre o fígado e o tecido adiposo é controlado em grau elevado pela atividade da PEP-carboxicinase, a qual limita a velocidade de ambas, da gliconeogênese e da gliceroneogênese. Os hormônios glicocorticoides, como o cortisol (esteroide biológico derivado do colesterol; ver Figura 21-48) e a dexametasona (glicocorticoide sintético), regulam os níveis de PEP-carboxicinase reciprocamente, no fígado e no tecido adiposo. Atuando nos receptores de glicocorticoides, esses hormônios esteroides aumentam a expressão do gene que codifica a PEP-carboxicinase no fígado, aumentando a gliconeogênese e a gliceroneogênese (Figura 21-22).



A estimulação da gliceroneogênese leva a um aumento na síntese de moléculas de triacilglicerol no fígado, e a sua liberação na corrente sanguínea. Ao mesmo tempo, no tecido adiposo, os glicocorticoides suprimem a expressão do gene que codifica a PEP-carboxicinase. Isso resulta em um decréscimo na gliceroneogênese no tecido adiposo. Como resultado, ocorre diminuição da reciclagem dos ácidos graxos, e mais ácidos graxos livres são liberados no sangue. Assim, a gliceroneogênese é regulada reciprocamente no fígado e no tecido adiposo, afetando o metabolismo dos lipídeos de formas opostas: uma menor velocidade da gliceroneogênese no tecido adiposo leva a uma maior liberação de ácidos graxos (e não reciclagem), ao passo que uma alta velocidade no fígado leva a uma maior síntese e exportação dos triacilgliceróis. O resultado líquido é um aumento no fluxo por meio do ciclo dos triacilgliceróis. Quando os glicocorticoides não estão mais presentes, o fluxo pelo ciclo diminui, já que a expressão da PEP-carboxicinase aumenta no tecido adiposo e diminui no fígado.

As tiazolidinedionas no tratamento do diabetes tipo 2 aumentam a gliceroneogênese



A recente atenção dada à gliceroneogênese surgiu, em parte, da ligação entre esta via e o diabetes. Os altos níveis de ácidos graxos livres no sangue interferem com a utilização da glicose nos músculos e promovem a resistência à insulina, que leva ao diabetes tipo 2. Uma classe de fármacos, chamados de **tiazolidinedionas**, reduz os níveis dos ácidos graxos circulantes no sangue e aumenta a sensibilidade à insulina. As tiazolidinedionas promovem a indução da PEP-carboxicinase no tecido adiposo (Figura 21-22), levando ao aumento na síntese dos

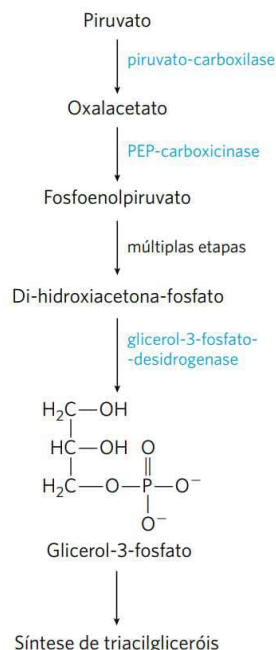


FIGURA 21-21 Gliceroneogênese. A via é, essencialmente, uma versão abreviada da gliconeogênese, partindo do piruvato até di-hidroxiacetona-fosfato (DHAP), seguindo-se a conversão de DHAP em glicerol-3-fosfato, utilizado para a síntese dos triacilgliceróis.

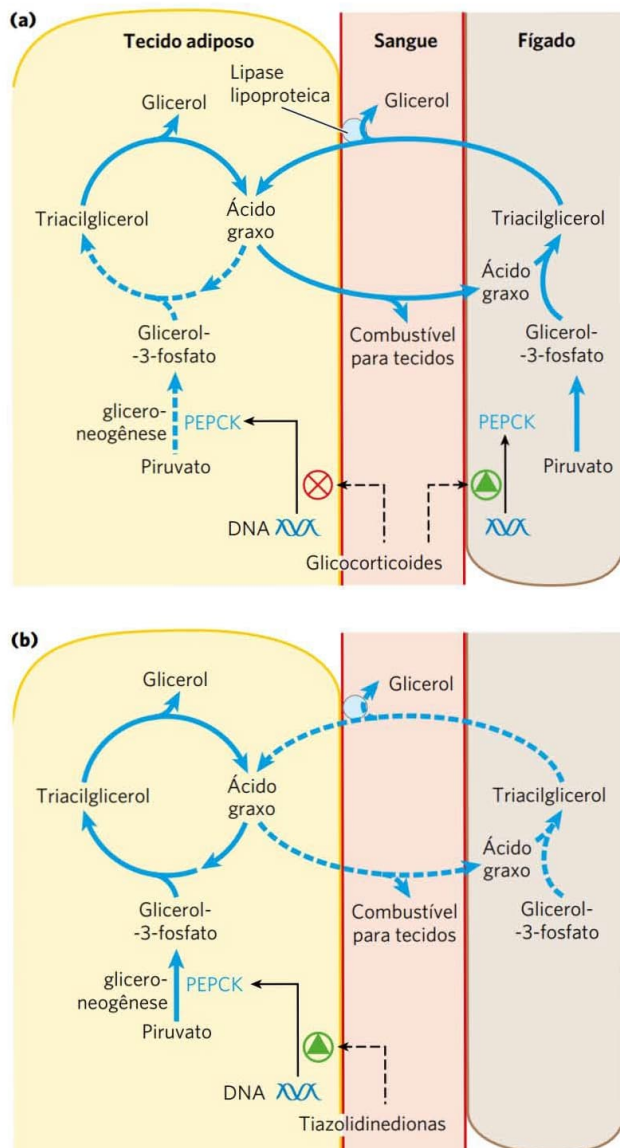


FIGURA 21-22 Regulação da gliceroneogênese. (a) Os hormônios glicocorticoides estimulam a gliceroneogênese e a gliconeogênese no fígado, enquanto suprimem a gliceroneogênese no tecido adiposo (pela regulação recíproca inversa do gene que expressa a PEP-carboxicinas [PEPCK] nos dois tecidos), aumentando o fluxo pelo ciclo do triacilglicerol. O glicerol formado pela degradação dos triacilgliceróis no tecido adiposo é liberado no sangue e transportado para o fígado, onde é convertido, principalmente, em glicose, embora parte seja convertida em glicerol-3-fosfato pela glicerol-cinase. (b) Uma classe de fármacos, chamados de tiazolidinedionas, atualmente é utilizada no tratamento do diabetes tipo 2. Nessa doença, os altos níveis de ácidos graxos livres no sangue interferem com a utilização da glicose nos músculos e promovem resistência à insulina. As tiazolidinedionas ativam um receptor nuclear, chamado de receptor ativado por proliferador do peroxissomo γ (PPAR γ), que induz a atividade da PEP-carboxicinas. De modo terapêutico, as tiazolidinedionas elevam a velocidade da gliceroneogênese, aumentando a ressíntese de triacilglicerol no tecido adiposo e reduzindo a quantidade de ácido graxo livre na corrente sanguínea.

precursores da gliceroneogênese. Portanto, o efeito terapêutico das tiazolidinedionas é devido, pelo menos em parte, ao aumento na gliceroneogênese, que, por sua vez, aumenta a ressíntese de triacilgliceróis no tecido adiposo e reduz a liberação de ácidos graxos livres do tecido adiposo para a corrente sanguínea. ■

RESUMO 21.2 Biossíntese de triacilgliceróis

- Os triacilgliceróis são formados pela reação de duas moléculas de acil-CoA graxo com glicerol-3-fosfato, formando ácido fosfatídico; esse produto é desfosforilado a um diacilglicerol e, então, acilado por uma terceira molécula de acil-CoA graxo para gerar um triacilglicerol.
- A síntese e a degradação dos triacilgliceróis são reguladas por hormônios.
- A mobilização e a reciclagem das moléculas de triacilglicerol resultam em um ciclo do triacilglicerol. Os triacilgliceróis são sintetizados novamente a partir de ácidos graxos livres e glicerol-3-fosfato, mesmo durante o jejum. A di-hidroxiacetona-fosfato, precursora do glicerol-3-fosfato, é derivada do piruvato via gliceroneogênese.

21.3 Biossíntese de fosfolipídeos de membrana

No Capítulo 10, foram apresentadas as duas principais classes de fosfolipídeos de membrana: glicerofosfolipídeos e esfingolipídeos. Muitas espécies diferentes de fosfolipídeos podem ser construídas pela combinação de diversos ácidos graxos e grupos que funcionam como cabeças polares utilizando o esqueleto de glicerol ou de esfingosina (ver Figuras 10-8 e 10-12). Todas as vias biossintéticas seguem alguns padrões básicos. Em geral, a formação dos fosfolipídeos a partir de precursores simples requer (1) síntese da molécula-esqueleto (glicerol ou esfingosina); (2) acoplamento do(s) ácido(s) graxo(s) ao esqueleto por meio de uma ligação éster ou amida; (3) adição de um grupo hidrofílico (cabeça polar) ao esqueleto por uma ligação fosfodiéster; e, em alguns casos, (4) alteração ou troca do grupo polar, gerando o produto final fosfolipídico.

Em células eucarióticas, a síntese dos fosfolipídeos ocorre principalmente sobre a superfície do RE liso e da membrana interna da mitocôndria. Alguns fosfolipídeos recém-formados permanecem no local de síntese, mas a maior parte é destinada para outras localizações celulares. O processo pelo qual os fosfolipídeos insolúveis em água movem-se do local de síntese para o ponto onde desempenharão suas funções não é totalmente conhecido, mas serão discutidos alguns mecanismos que emergiram em estudos recentes.

As células dispõem de duas estratégias para o acoplamento dos grupos polares dos fosfolipídeos

As primeiras etapas na síntese dos glicerofosfolipídeos são compartilhadas com a via de síntese dos triacilgliceróis (Figura 21-17): dois grupos acil-graxo são esterificados no C-1 e no C-2 do L-glicerol-3-fosfato, formando ácido fosfatídico.

dico. Comumente, mas não invariavelmente, o ácido graxo em C-1 é saturado e aquele em C-2 é insaturado. Uma segunda via de síntese do ácido fosfatídico é a fosforilação de um diacilglicerol por uma cinase específica.

O grupo polar dos glicerosfosfolipídeos é unido por meio de uma ligação fosfodiéster, em que cada uma das duas hidroxilas alcoólicas (uma no grupo polar e a outra no C-3 do glicerol) forma um éster com o ácido fosfórico (**Figura 21-23**). No processo biossintético, uma das hidroxilas é, primeiramente, ativada pela ligação a um nucleotídeo, a citidina-difosfato (CDP). A citidina-monofosfato (CMP) é, então, deslocada por um ataque nucleofílico da outra hidroxila (**Figura 21-24**). A CDP é acoplada ao diacilglicerol, formando o ácido fosfatídico ativado **CDP-diacilglicerol** (estratégia 1), ou à hidroxila do grupo polar (estratégia 2). As células eucarióticas utilizam ambas as estratégias, ao passo que as bactérias utilizam apenas a primeira. A importância central dos nucleotídeos de citidina na biossíntese dos lipídeos foi descoberta por Eugene P. Kennedy no início da década de 1960, e essa via é comumente chamada de Via Kennedy.

A síntese dos fosfolipídeos em *E. coli* utiliza CDP-diacilglicerol

A primeira estratégia para o acoplamento do grupo polar é ilustrada pela síntese de fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilglicerol em *E. coli*. O diacilglicerol é ativado por condensação do ácido fosfatídico com citidina-trifosfato (CTP), formando CDP-diacilglicerol, com a eliminação de pirofosfato (**Figura 21-25**). O deslocamento de CMP pelo ataque nucleofílico efetuado pelo grupo hidroxila da serina

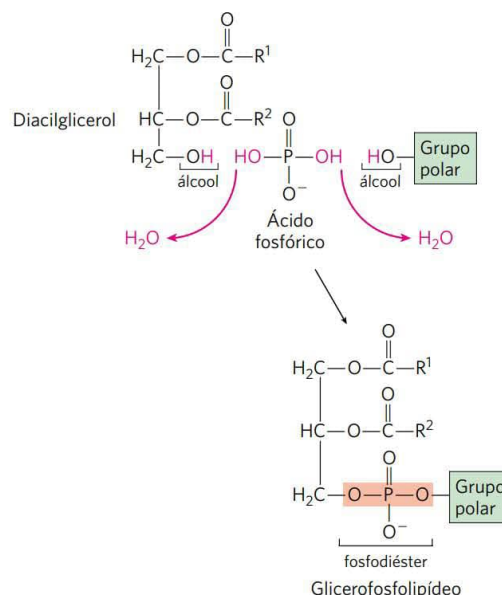


FIGURA 21-23 Ligação do grupo polar. O grupo polar do fosfolipídeo é acoplado ao diacilglicerol por meio de uma ligação fosfodiéster (sombreada em cor salmão), formada quando o ácido fosfórico é condensado com dois álcoois, eliminando duas moléculas de H_2O .

ou pela hidroxila em C-1 do glicerol-3-fosfato gera **fosfatidilserina** ou fosfatidilglicerol-3-fosfato, respectivamente. O último sofre um processamento adicional pela clivagem do monoéster de fosfato (com a liberação de P_i), gerando **fosfatidilglicerol**.



Eugene P. Kennedy, 1919-2011
(Fonte: cortesia da família de EPK.)

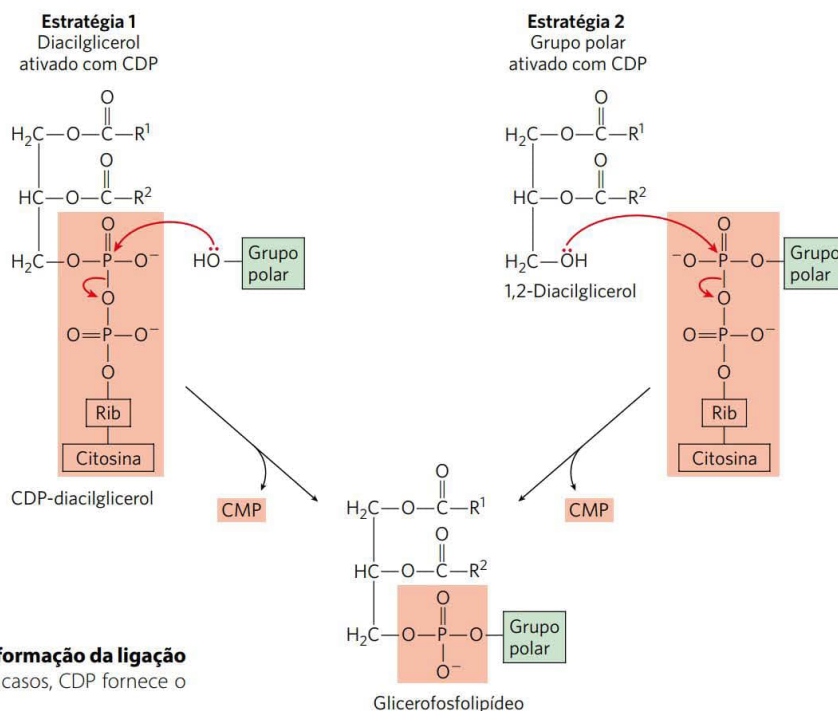


FIGURA 21-24 Duas estratégias gerais para a formação da ligação fosfodiéster dos fosfolipídeos. Em ambos os casos, CDP fornece o grupo fosfato da ligação fosfodiéster.

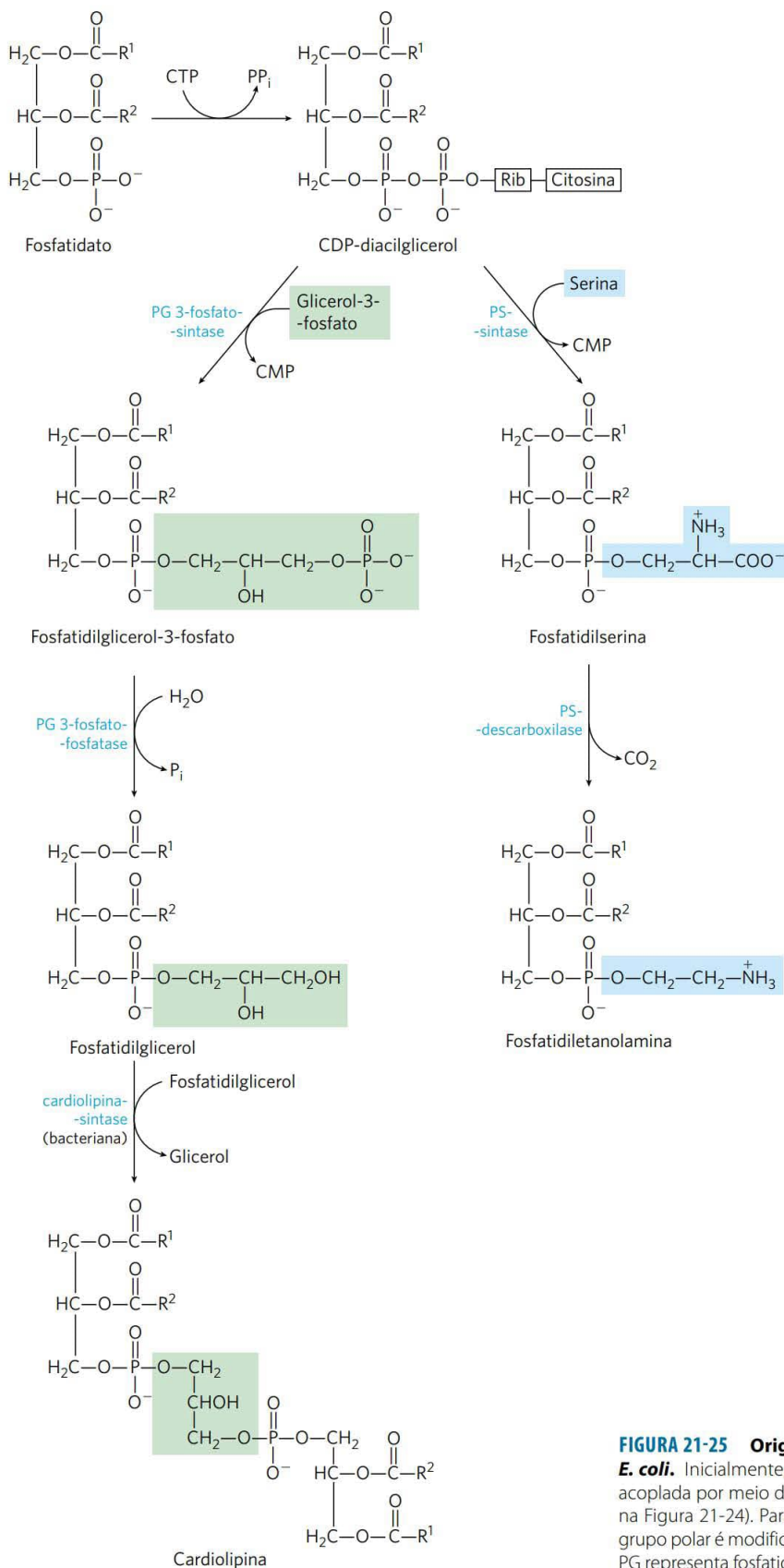
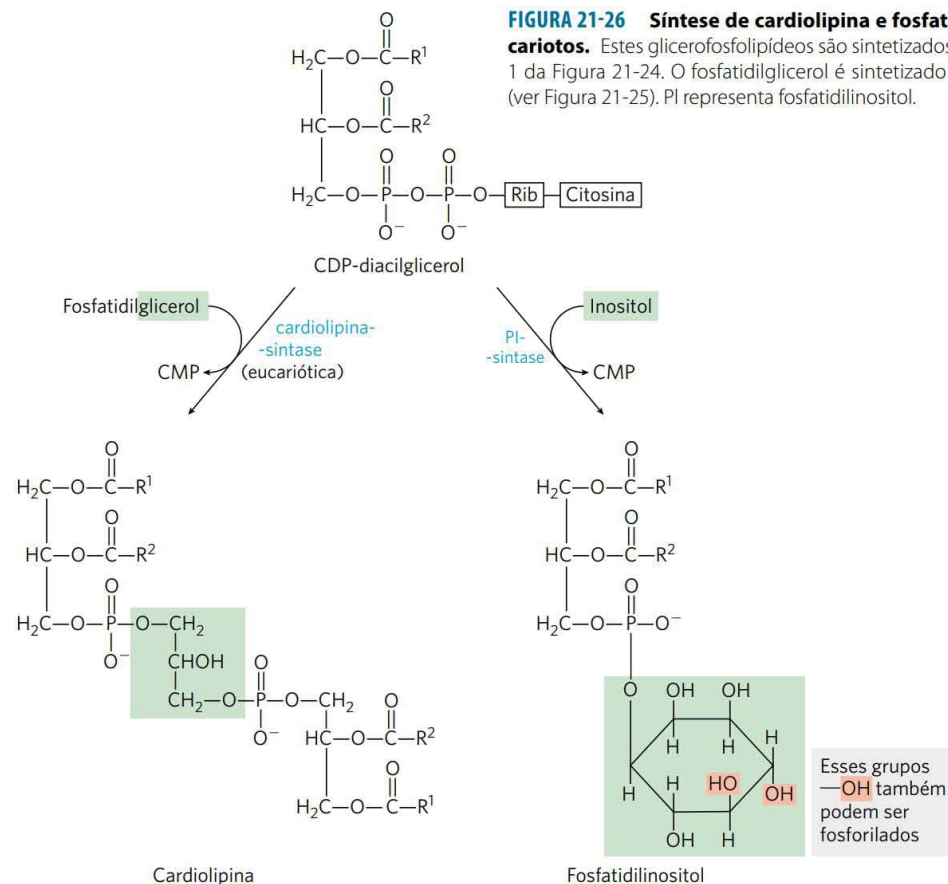


FIGURA 21-25 Origem dos grupos polares dos fosfolípidos em *E. coli*. Inicialmente, uma cabeça polar (serina ou glicerol-3-fosfato) é acoplada por meio de um intermediário CDP-diacylglicerol (estratégia 1 na Figura 21-24). Para outros fosfolípidos que não a fosfatidilserina, o grupo polar é modificado, como mostrado aqui. Nos nomes das enzimas, PG representa fosfatidilglicerol; PS, fosfatidilserina.



Fosfatidilserina e fosfatidilglicerol podem funcionar como precursores de outros lipídeos de membrana em bactérias (Figura 21-25). A descarboxilação da porção serina da fosfatidilserina, catalisada pela fosfatidilserina-decarboxilase, gera **fosfatidiletanolamina**. Em *E. coli*, a condensação de duas moléculas de fosfatidilglicerol, com a eliminação de um glicerol, forma a **cardiolipina**, em que dois diacilgliceróis são ligados por meio de uma cabeça polar em comum.

Os eucariotos sintetizam fosfolípídeos aniônicos a partir de CDP-diacilglicerol

Nos eucariotos, fosfatidilglicerol, cardiolipina e fosfatidilinositol (todos fosfolípídeos aniônicos; ver Figura 10-8) são sintetizados pela mesma estratégia utilizada para a síntese dos fosfolípídeos em bactérias. O fosfatidilglicerol é formado exatamente como nas bactérias. A síntese da cardiolipina em eucariotos é um pouco diferente: o fosfatidilglicerol condensa-se com CDP-diacilglicerol (**Figura 21-26**), e não com outra molécula de fosfatidilglicerol, como em *E. coli* (Figura 21-25).

O fosfatidilinositol é sintetizado pela condensação de CDP-diacilglicerol com inositol (Figura 21-26). **Fosfatidilinositol-cinases** específicas convertem, então, o fosfatidilinositol em seus derivados fosforilados. O fosfatidilinositol

e seus produtos fosforilados localizados na membrana plasmática exercem uma função central na transdução de sinal em eucariotos (ver Figuras 12-10, 12-11 e 12-20).

As vias eucarióticas para síntese de fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina são inter-relacionadas

As leveduras, assim como as bactérias, são capazes de produzir fosfatidilserina pela condensação de CDP-diacilglicerol e serina e podem sintetizar fosfatidiletanolamina a partir de fosfatidilserina em uma reação catalisada pela fosfatidilserina-decarboxilase (**Figura 21-27**). A fosfatidiletanolamina pode ser convertida em **fosfatidilcolina** (lecitina) pela adição de três grupos metila ao seu grupo amino; *S*-adenosilmetionina é o doador de grupos metila (ver Figura 18-18) para todas as três reações de metilação. As vias de síntese de fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina em leveduras estão resumidas na **Figura 21-28**. Essas vias são as principais fontes de fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina em todas as células eucarióticas.

Nos mamíferos, a fosfatidilserina não é sintetizada a partir de CDP-diacilglicerol; em vez disso, ela é derivada da fosfatidiletanolamina ou da fosfatidilcolina por meio de uma reação de troca do grupo polar; essa troca pode ocorrer por um de dois processos que ocorrem no retículo endoplas-

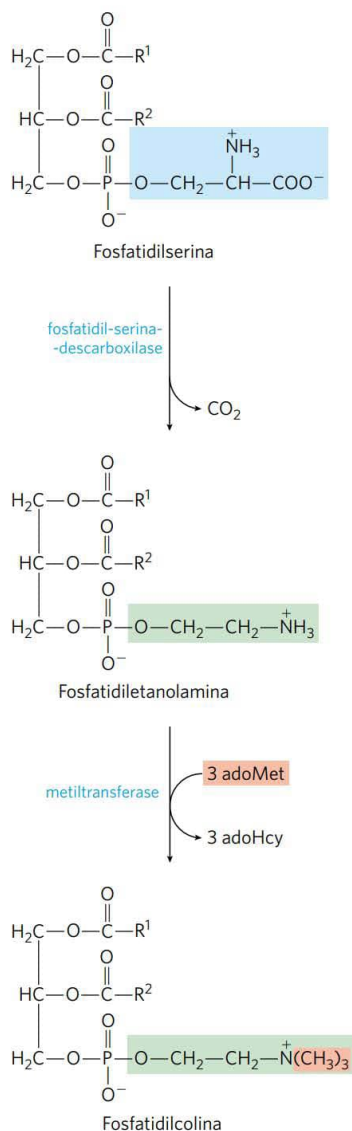


FIGURA 21-27 A principal via partindo de fosfatidilserina até fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina em todos os eucariotos. AdoMet representa S-adenosilmetionina; adoHcy, S-adenosilhomocisteína.

mático (**Figura 21-29a**). A síntese de fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina nos mamíferos ocorre pela estratégia 2 da Figura 21-24: fosforilação e ativação do grupo polar, seguidos pela condensação com diacilglicerol. Por exemplo, a colina é reutilizada (“via de recuperação”) por fosforilação, seguida de conversão em CDP-colina pela condensação com CTP. Um diacilglicerol desloca CMP da CDP-colina, produzindo fosfatidilcolina (Figura 21-29b). Uma via de recuperação análoga converte a etanolamina obtida na dieta em fosfatidiletanolamina. No fígado, a fosfatidilcolina também é produzida pela metilação de fosfatidiletanolamina (com S-adenosilmetionina, como descrito anteriormente), porém,

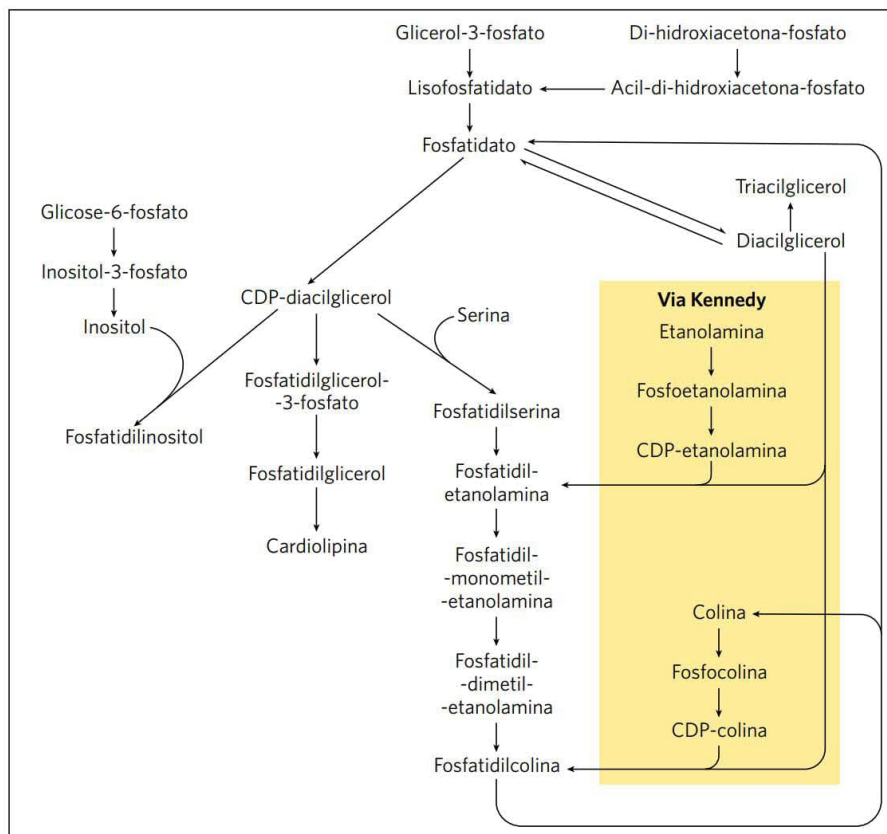


FIGURA 21-28 Resumo das vias de síntese dos principais fosfolípidos e dos triacilgliceróis em um eucarioto (leveduras). O ácido fosfatídico é formado por transacilação do L-glicerol-3-fosfato com dois grupos acil-graxos doados por acil-CoA. A enzima ácido fosfatídico fosfatase (lipina) converte o ácido fosfatídico em diacilglicerol, que, na via Kennedy, condensa-se com o grupo polar ativado por CDP (etanolamina ou colina) para formar fosfatidiletanolamina ou fosfatidilcolina. De modo alternativo, o ácido fosfatídico pode ser ativado com a porção CDP, que é deslocada pela condensação com o grupo álcool que formará a cabeça polar – inositol, glicerol-3-fosfato ou serina, formando fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol ou fosfatidilserina. A descarboxilação da fosfatidilserina gera fosfatidiletanolamina e a metilação da fosfatidiletanolamina produz fosfatidilcolina. Não estão mostradas aqui as reações de troca de grupo na cabeça polar (ver Figura 21-29a) que interconvertem fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e fosfatidilcolina em mamíferos. O ácido lisofosfatídico é o ácido fosfatídico do qual foi removido um dos dois grupos acil-graxo. [Fonte: informação obtida de G. M. Carman e G.-S. Han, *Annu. Rev. Biochem.* 80:859, 2011, Fig. 2.]

em todos os outros tecidos, a fosfatidilcolina é produzida apenas por condensação de diacilglicerol e CDP-colina.

A síntese de plasmalogênio requer a formação de um álcool graxo unido por ligação éter

A via biossintética dos éter-lipídeos, incluindo os **plasmalogênios** e o **fator de ativação plaquetário** (ver Figura 10-9), envolve o deslocamento de um grupo acil-graxo esterificado por um álcool de cadeia longa para formar a ligação éter (**Figura 21-30**). Segue-se a ligação do grupo polar do lipídeo por mecanismos essencialmente iguais àqueles utilizados na síntese dos fosfolípidos comuns, formados por ligação éster. Por fim, a ligação dupla característica dos plasmalogênios (sombreada em azul na Figura 21-30) é introduzida pela ação de uma oxidase de função mista semelhante àquela responsável pela insaturação dos ácidos

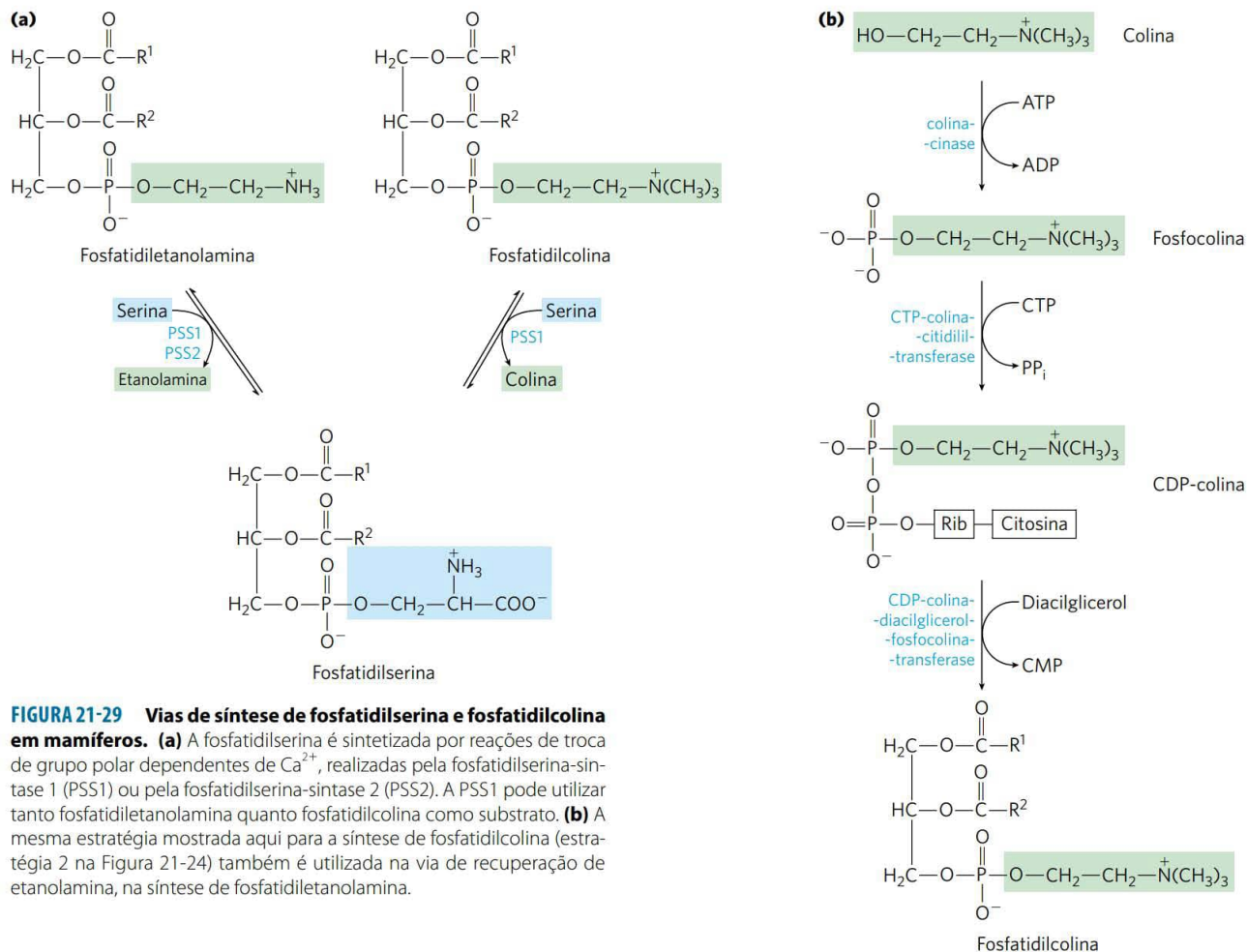


FIGURA 21-29 Vias de síntese de fosfatidilserina e fosfatidilcolina em mamíferos. (a) A fosfatidilserina é sintetizada por reações de troca de grupo polar dependentes de Ca^{2+} , realizadas pela fosfatidilserina-sintase 1 (PSS1) ou pela fosfatidilserina-sintase 2 (PSS2). A PSS1 pode utilizar tanto fosfatidiletanolamina quanto fosfatidilcolina como substrato. (b) A mesma estratégia mostrada aqui para a síntese de fosfatidilcolina (estratégia 2 na Figura 21-24) também é utilizada na via de recuperação de etanolamina, na síntese de fosfatidiletanolamina.

graxos (Figura 21-13). O peroxissomo é o principal local de síntese dos plasmalogenos.

As vias de síntese de esfingolipídeos e glicerofosfolipídeos compartilham precursores e alguns mecanismos

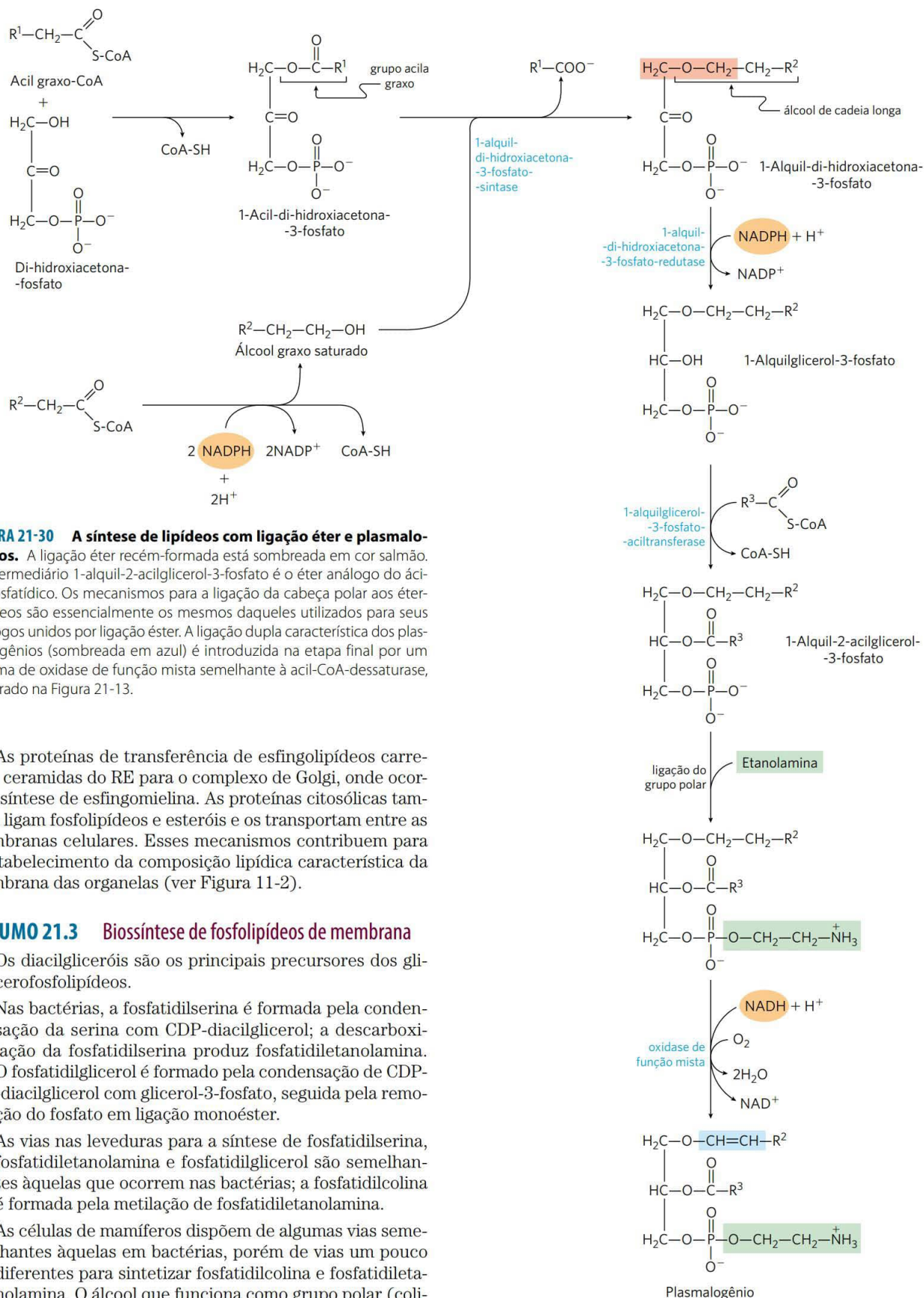
A biossíntese dos esfingolipídeos ocorre em quatro estágios: (1) síntese da amina de 18 carbonos, **esfinganina**, a partir de palmitoil-CoA e serina; (2) acoplamento de um ácido graxo por uma ligação amida, gerando **N-acilesfinganina**; (3) dessaturação da porção esfinganina, formando **N-acilesfingosina** (ceramida); e (4) acoplamento de um grupo polar para a produção de esfingolipídeos, como **cerebrosídeos** ou **esfingomielinas** (Figura 21-31). As primeiras etapas dessa via ocorrem no retículo endoplasmático, ao passo que o acoplamento dos grupos que funcionarão como cabeças polares no estágio 4 ocorre no complexo de Golgi. A via compartilha diversas características com as vias de síntese dos glicerofosfolipídeos: NADPH fornece o poder redutor, e os ácidos graxos entram na via como seus derivados CoA ativados. Na formação dos cerebrosídeos, os açúcares entram na via como seus derivados nucleotídicos ativados. O acoplamento do grupo polar na síntese dos esfingolipídeos apresenta diversos aspectos novos. A fosfatidilcolina,

em vez de CDP-colina, atua como doadora de fosfocolina na síntese de esfingomielina.

Nos glicolipídeos e os **gangliosídeos** (ver Figura 10-12), o açúcar que funciona como a cabeça polar é acoplado diretamente à hidroxila em C-1 da esfingosina por meio de uma ligação glicosídica, e não por uma ligação fosfodiéster. O doador do açúcar é um UDP-açúcar (UDP-glicose ou UDP-galactose).

Os lipídeos polares são direcionados para membranas celulares específicas

Após a síntese no RE liso, os lipídeos polares, incluindo glicerofosfolipídeos, esfingolipídeos e glicolipídeos, são inseridos em membranas celulares específicas em proporções específicas, por mecanismos ainda não conhecidos. Os lipídeos de membrana são insolúveis em água, de modo que não podem simplesmente difundir do seu local de síntese (o RE) para o seu local de inserção. Em vez disso, eles são transportados do RE para o complexo de Golgi, onde pode ocorrer síntese adicional. Eles são, então, transportados em vesículas membranosas que brotam do complexo de Golgi, movem-se e fundem-se com a membrana-alvo.



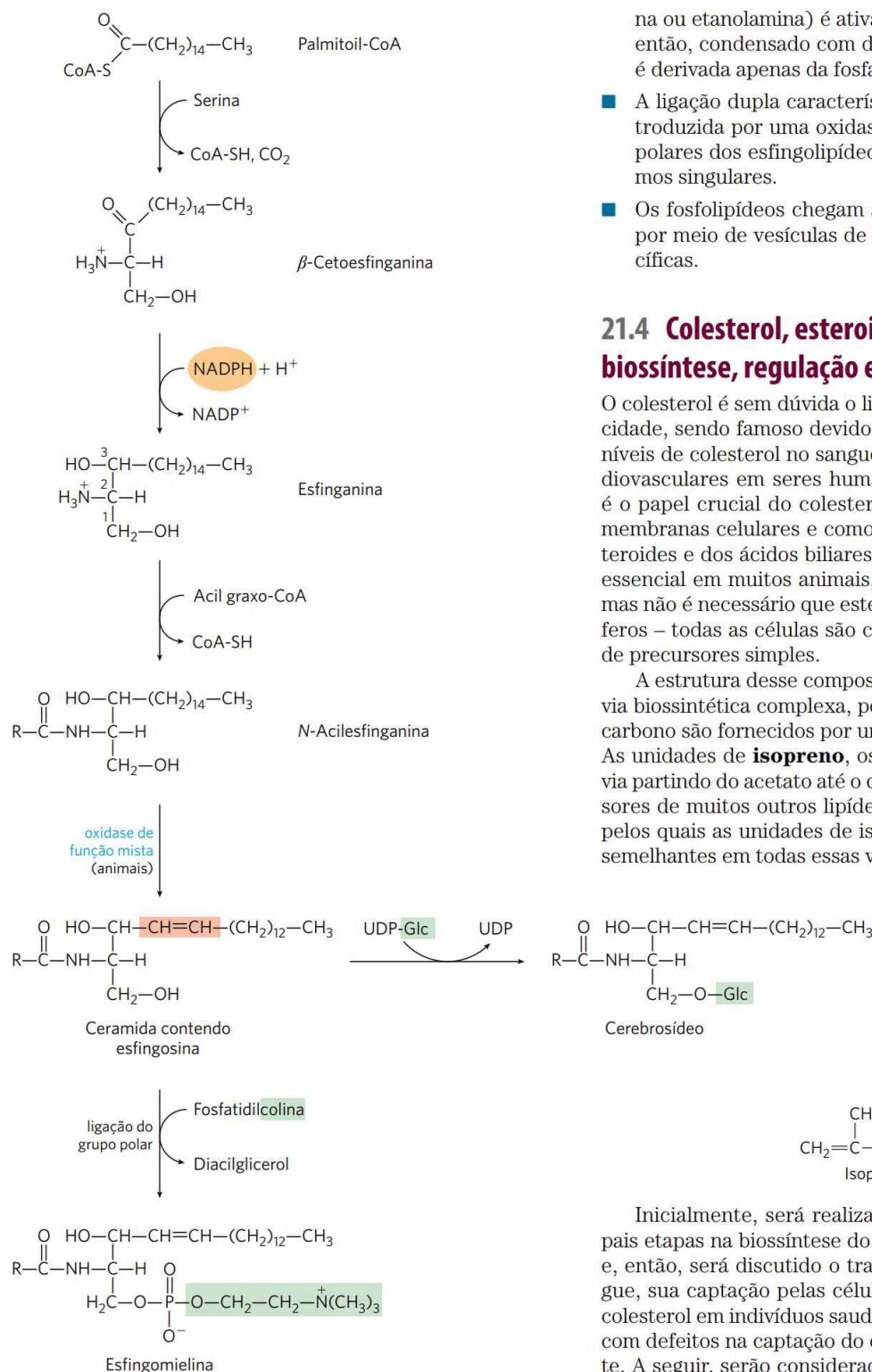


FIGURA 21-31 Biossíntese de esfingolipídeos. A condensação da palmitoil-CoA com a serina (formando β-cetoesfinganina), seguida da redução por NADPH, forma esfinganina, que é, então, acilada a N-acilesfinganina (uma ceramida). Nos animais, uma ligação dupla (sombreada em cor salmão) é formada por uma oxidase de função mista antes da adição final do grupo polar: fosfatidilcolina, formando esfingomielina, ou glicose, formando um cerebrosídeo.

na ou etanolamina) é ativado como um derivado CDP e, então, condensado com diacilglicerol. A fosfatidilserina é derivada apenas da fosfatidiletanolamina.

- A ligação dupla característica dos plasmalogênios é introduzida por uma oxidase de função mista. Os grupos polares dos esfingolipídeos são acoplados por mecanismos singulares.
- Os fosfolipídeos chegam a seus destinos intracelulares por meio de vesículas de transporte ou proteínas específicas.

21.4 Colesterol, esteroides e isoprenoides: biossíntese, regulação e transporte

O colesterol é sem dúvida o lipídeo que recebe maior publicidade, sendo famoso devido à forte correlação entre altos níveis de colesterol no sangue e incidência de doenças cardiovasculares em seres humanos. Muito menos divulgado é o papel crucial do colesterol como um componente das membranas celulares e como precursor dos hormônios esteroides e dos ácidos biliares. O colesterol é uma molécula essencial em muitos animais, incluindo os seres humanos, mas não é necessário que esteja presente na dieta de mamíferos – todas as células são capazes de sintetizá-lo a partir de precursores simples.

A estrutura desse composto de 27 carbonos sugere uma via biossintética complexa, porém todos os seus átomos de carbono são fornecidos por um único precursor – o acetato. As unidades de **isopreno**, os intermediários essenciais na via partindo do acetato até o colesterol, também são precursores de muitos outros lipídeos naturais, e os mecanismos pelos quais as unidades de isopreno são polimerizadas são semelhantes em todas essas vias.

Inicialmente, será realizada uma descrição das principais etapas na biossíntese do colesterol a partir de acetato, e, então, será discutido o transporte do colesterol no sangue, sua captação pelas células, a regulação da síntese do colesterol em indivíduos saudáveis e sua regulação naqueles com defeitos na captação do colesterol ou em seu transporte. A seguir, serão considerados outros componentes celulares derivados do colesterol, como os ácidos biliares e os hormônios esteroides. Por fim, será apresentado um esboço das vias biossintéticas de alguns dos muitos compostos derivados das unidades de isopreno, que compartilham etapas iniciais com a via de síntese do colesterol, ilustrando a extraordinária versatilidade das condensações de isoprenoides na biossíntese.

O colesterol é formado a partir da acetil-CoA em quatro etapas

O colesterol, assim como os ácidos graxos de cadeia longa, é formado a partir de acetil-CoA. Mas o esquema de montagem do colesterol é muito diferente daquele dos ácidos graxos de cadeia longa. Nos primeiros experimentos para o estudo dessa via, os animais eram alimentados com acetato marcado com ^{14}C , ou no carbono da metila ou no carbono da carboxila. O padrão de marcação no colesterol isolado dos dois grupos de animais (**Figura 21-32**) forneceu as informações para se desvendar as etapas enzimáticas na biossíntese do colesterol.

A síntese ocorre em quatro estágios, como representado na **Figura 21-33**: ❶ condensação de três unidades de acetato, formando um intermediário de seis carbonos, o mevalonato; ❷ conversão do mevalonato em unidades de isopreno ativadas; ❸ polimerização de seis unidades de isopreno com 5 carbonos, formando o esqualeno linear, com 30 carbonos; e ❹ ciclização do esqualeno para formar os quatro anéis do núcleo esteroide, com uma série de mudanças adicionais (oxidações, remoção ou migração de grupos metila) para produzir o colesterol.

Estágio ❶ Síntese de mevalonato a partir do acetato O primeiro estágio na biossíntese do colesterol leva ao intermediário **mevalonato** (**Figura 21-34**). Duas moléculas de acetil-CoA condensam-se para formar acetoacetil-CoA, que se condensa com uma terceira molécula de acetil-CoA, gerando o composto de seis carbonos **β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA (HMG-CoA)**. As duas primeiras reações são catalisadas pela **acetil-CoA-acetil-transferase** e pela **HMG-CoA-sintase**, respectivamente. A HMG-CoA-sintase citosólica dessa via é distinta da isoenzima mitocondrial, que catalisa a síntese de HMG-CoA na formação de corpos cetônicos (ver Figura 17-18).

A terceira reação é o passo comprometido com a via: a redução de HMG-CoA em mevalonato, para o qual cada uma de duas moléculas de NADPH doa dois elétrons. A **HMG-CoA-redutase**, uma proteína integral de membrana do RE liso, é o principal ponto de regulação da via do colesterol, como será visto.

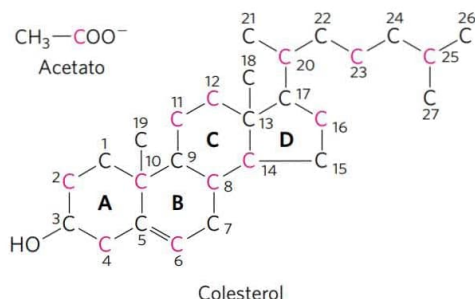


FIGURA 21-32 Origem dos átomos de carbono do colesterol. A origem pode ser deduzida a partir de experimentos usando acetato marcado no carbono da metila (em preto) ou no carbono da carboxila (em vermelho). Os anéis individuais do sistema de anéis fundidos são denominados de A a D.

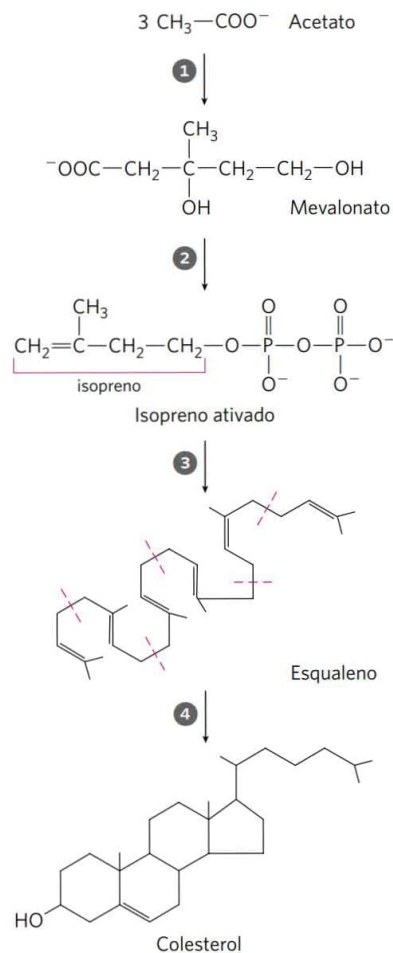


FIGURA 21-33 Resumo da biossíntese de colesterol. Os quatro estágios são discutidos no texto. As unidades isoprenoides no esqualeno estão demarcadas pelas linhas tracejadas em vermelho.

Estágio ❷ Conversão de mevalonato a dois isoprenos ativados No próximo estágio, três grupos fosfato são transferidos de três moléculas de ATP para o mevalonato (**Figura 21-35**). O fosfato ligado ao grupo hidroxila em C-3 do mevalonato no intermediário 3-fosfo-5-pirofosfomevalonato é um bom grupo de saída; na próxima etapa, tanto este fosfato quanto o grupo carboxila vizinho saem, produzindo uma ligação dupla no produto de cinco carbonos, o **Δ^3 -isopentenil-pirofosfato**. Esse é o primeiro de dois isoprenos ativados centrais para a formação do colesterol. A isomerização do **Δ^3 -isopentenil-pirofosfato** gera o segundo isopreno ativado, o **dimetilalil-pirofosfato**. A síntese do isopentenil-pirofosfato no citoplasma de células vegetais segue a via descrita aqui. Entretanto, os cloroplastos das plantas e de muitas bactérias utilizam uma via independente de mevalonato. Essa via alternativa não ocorre em animais, de modo que ela é um alvo interessante para o desenvolvimento de novos antibióticos.

Estágio ❸ Condensação de seis unidades isopreno ativadas para formar o esqualeno O isopentenil-pirofosfato e o dimetilalil-

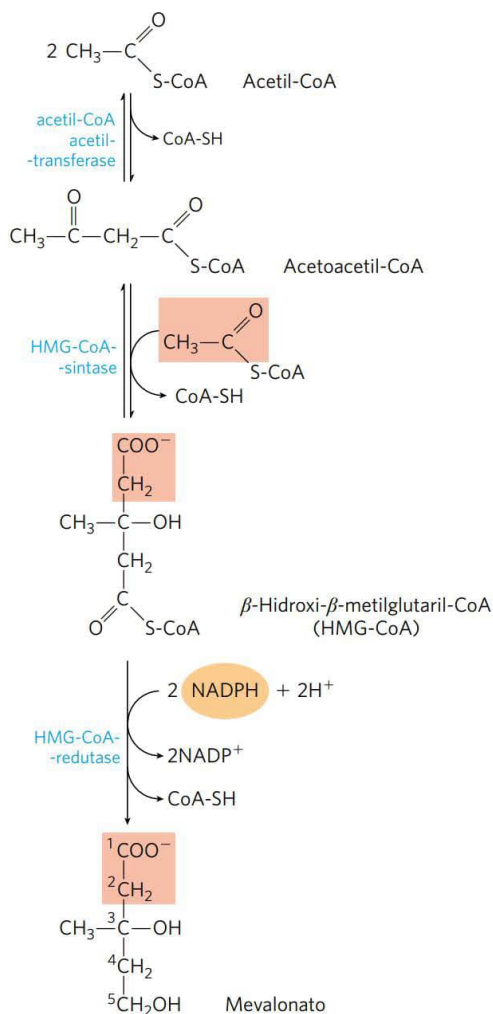


FIGURA 21-34 Formação do mevalonato a partir de acetil-CoA. A origem dos carbonos C-1 e C-2 do mevalonato a partir de acetil-CoA está mostrada em cor salmão.

-pirofosfato sofrem, agora, uma condensação “cabeça com cauda”, em que um grupo pirofosfato é deslocado, sendo formada uma cadeia de 10 carbonos, o **geranyl-pirofosfato** (Figura 21-36). (A “cabeça” é a extremidade na qual o pirofosfato está ligado.) O geranyl-pirofosfato sofre outra condensação do tipo “cabeça com cauda” com o isopentenil-pirofosfato, gerando um intermediário de 15 carbonos, o **farnesil-pirofosfato**. Por fim, duas moléculas de farnesil-pirofosfato ligam-se cabeça com cabeça, com a eliminação de ambos os grupos pirofosfato, formando o **esqualeno**. O esqualeno tem 30 carbonos, 24 na cadeia principal e seis na forma de ramificações de grupos metila.

Os nomes comuns desses intermediários derivam das fontes das quais eles foram primeiro isolados. O geraniol, um componente do óleo das rosas, tem aroma de gerânios, e o farnesol é um composto aromático encontrado nas flo-

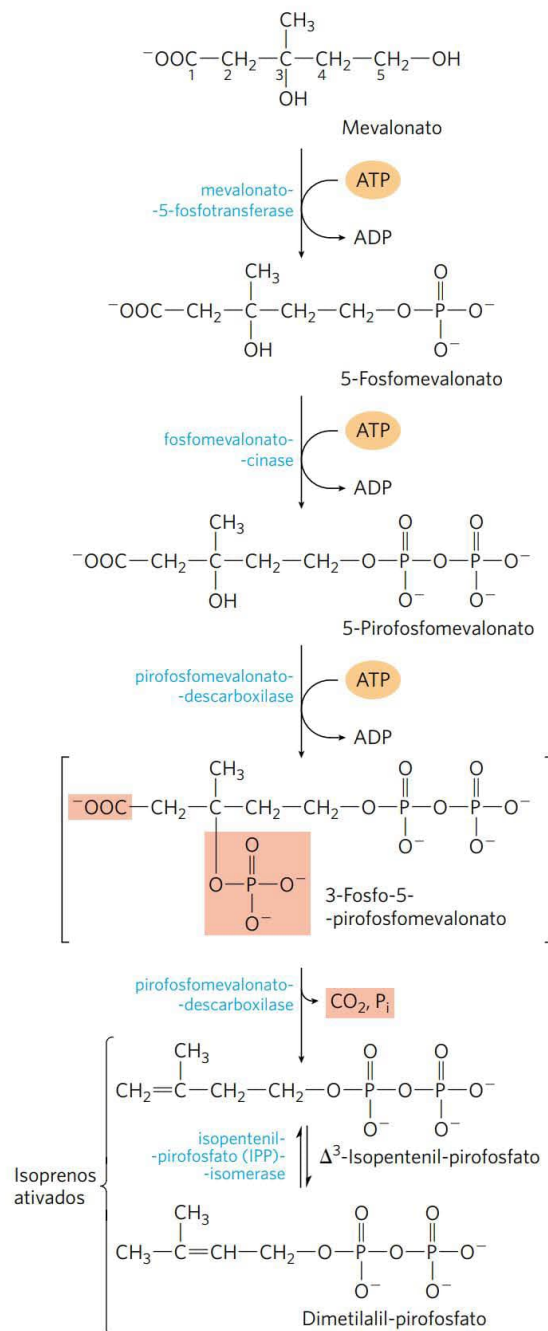


FIGURA 21-35 Conversão do mevalonato em unidades ativadas de isopreno. Seis dessas unidades ativadas se combinam para formar o esqualeno (ver Figura 21-36). Os grupos de saída do 3-fosfo-5-pirofosfomevalonato estão sombreados em cor salmão. O intermediário entre colchetes é hipotético.

res da acácia-amarela (*Acacia farnesiana*). Muitos aromas naturais de origem vegetal são sintetizados a partir de unidades de isopreno. O esqualeno foi inicialmente isolado do fígado de tubarão (do gênero *Squalus*).

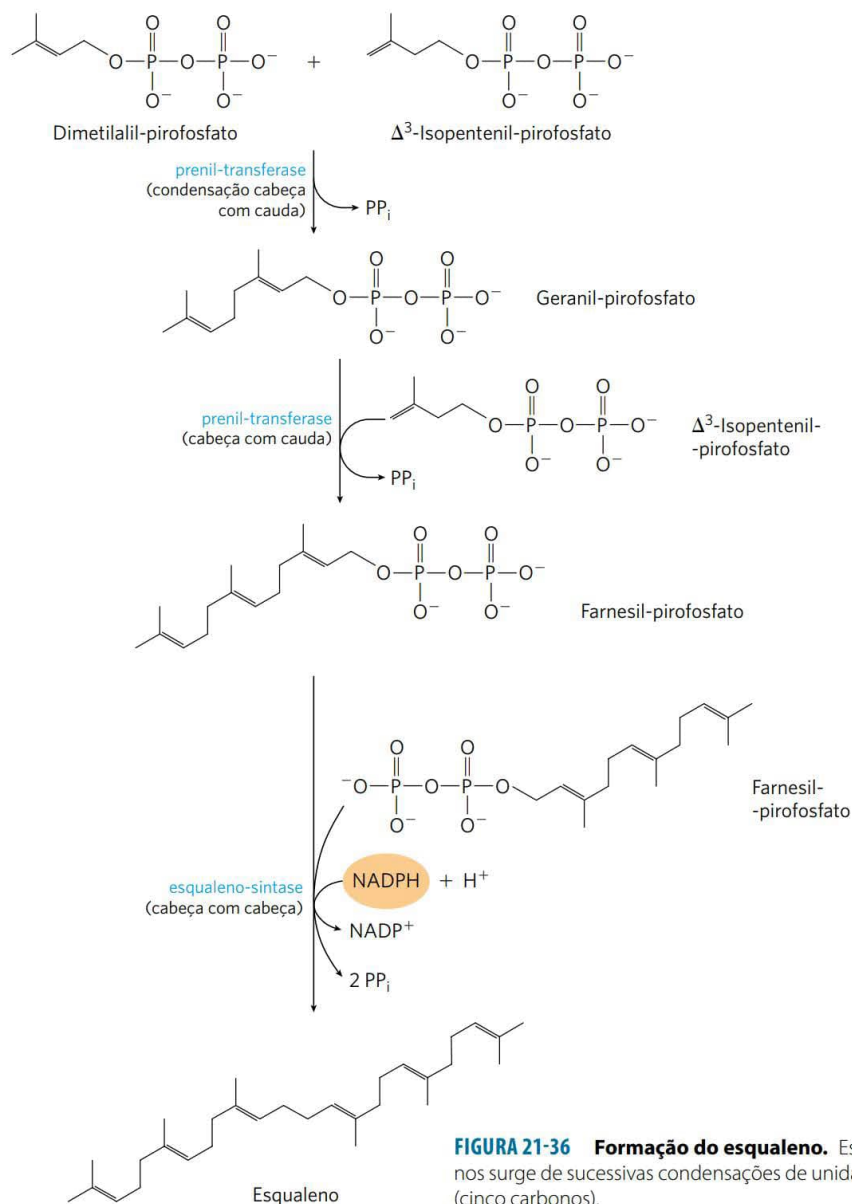


FIGURA 21-36 Formação do esqualeno. Esta estrutura de 30 carbonos surge de sucessivas condensações de unidades ativadas de isopreno (cinco carbonos).

Estágio 4 Conversão de esqualeno no núcleo esteroide de quatro anéis Quando a molécula de esqualeno é representada como na **Figura 21-37**, torna-se evidente a relação entre a sua estrutura linear e a estrutura cíclica dos esteróis. Todos os esteróis têm os quatro anéis fundidos que formam o núcleo esteroide, e todos são álcoois, com um grupo hidroxila em C-3 – daí o nome “esterol”. A atividade da **esqualeno-monoxygenase** adiciona um átomo de oxigênio do O_2 à extremidade da cadeia do esqualeno, formando um epóxido. Essa enzima é outra oxidase de função mista; o NADPH reduz o outro átomo de oxigênio do O_2 a H_2O . As ligações duplas do produto, o **esqualeno-2,3-epóxido**, estão posicionadas de modo que uma notável reação em concerto é capaz de converter o esqualeno epóxido linear em uma estrutura cíclica. Nas células animais, essa ciclização resulta na formação de

lanosterol, que contém os quatro anéis característicos do núcleo esteroide. O lanosterol é finalmente convertido em colesterol em uma série de aproximadamente 20 reações, que incluem a migração de alguns grupos metila e a remoção de outros. A elucidação dessa extraordinária via biossintética, uma das mais complexas conhecidas, foi realizada por Konrad Bloch, Feodor Lynen, John Cornforth e George Popják no fim da década de 1950.

O colesterol é o esterois característico das células animais. Por sua vez, os vegetais, os fungos e os protistas sintetizam outros esteróis intimamente relacionados. Eles utilizam a mesma via sintética até a formação de esqualeno-2,3-epóxido, ponto em que as vias divergem levemente, gerando outros esteróis, como o estigmasterol em muitas plantas e o ergosterol nos fungos (**Figura 21-37**).



Konrad Bloch, 1912-2000
[Fonte: AP/Wide World Photos.]



Feodor Lynen, 1911-1979
[Fonte: AP/Wide World Photos.]



John Cornforth, 1917-2013
[Fonte: Bettmann/Corbis.]



George Popják, 1914-1998
[Fonte: Professor George Joseph Popják, MD, DSc, FRS. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19:830, 1999. ©1999 Wolters Kluwer Health.]

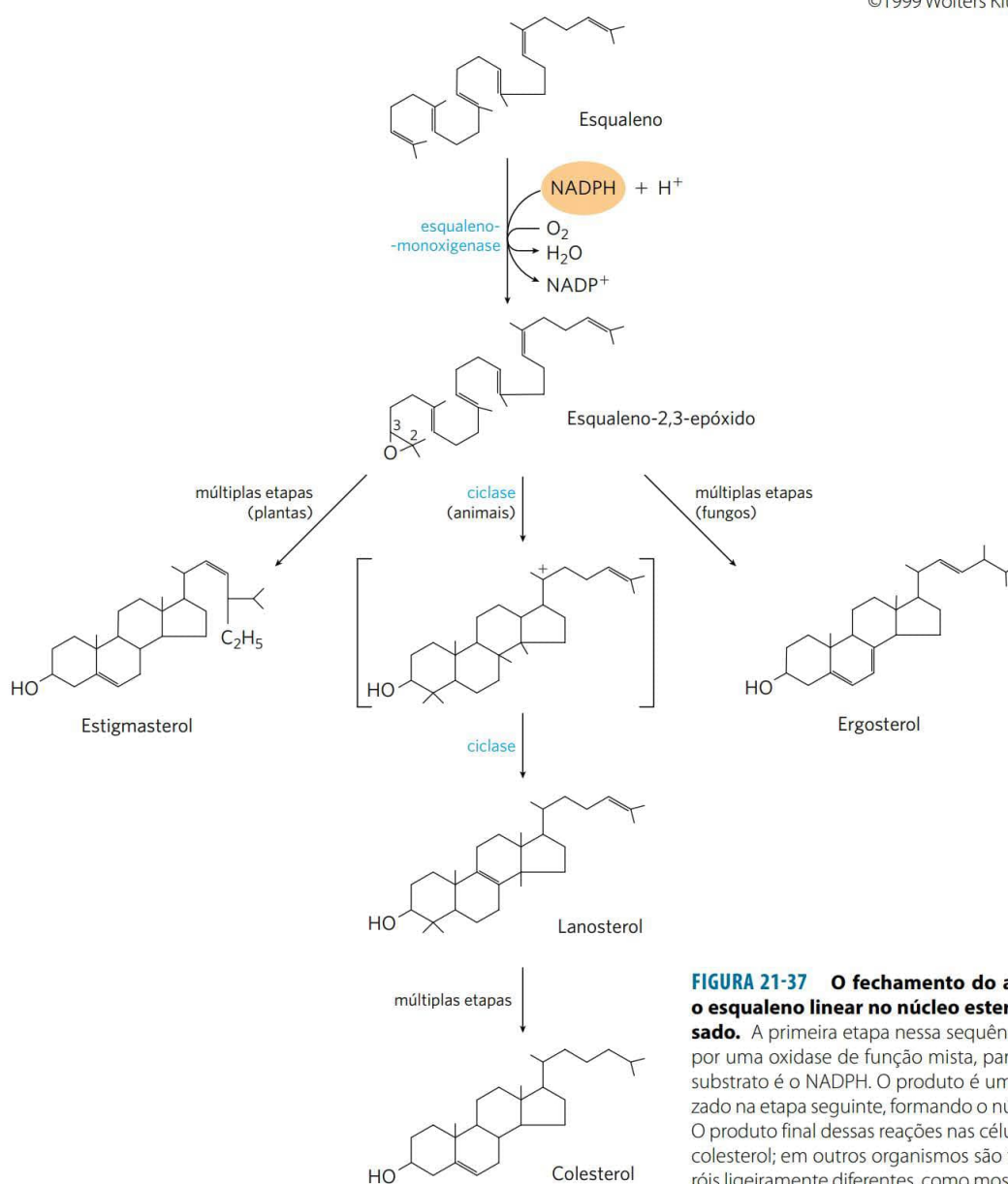


FIGURA 21-37 O fechamento do anel converte o esqualeno linear no núcleo esteroide condensado. A primeira etapa nessa sequência é catalisada por uma oxidase de função mista, para a qual o cosubstrato é o NADPH. O produto é um epóxido, ciclizado na etapa seguinte, formando o núcleo esteroide. O produto final dessas reações nas células animais é o colesterol; em outros organismos são formados esteróis ligeiramente diferentes, como mostrado na figura.

PROBLEMA 21-1 Custo energético da síntese do esqualeno

Qual é o custo energético da síntese de esqualeno a partir de acetil-CoA, em número de ATP por molécula de esqualeno sintetizada?

Solução: na via de acetil-CoA a esqualeno, o ATP é consumido apenas nas etapas que convertem mevalonato em isoprenos ativados, precursores do esqualeno. Três moléculas de ATP são utilizadas para criar cada um dos seis isoprenos ativados necessários para a construção do esqualeno, em um custo total de 18 moléculas de ATP.

0 colesterol tem destinos diversos

A maior parte da síntese do colesterol em vertebrados ocorre no fígado. Uma pequena fração do colesterol sintetizado ali é incorporada nas membranas dos hepatócitos, mas a maior parte dele é exportada em uma de três formas: ácidos biliares, colesterol biliar ou ésteres de colesterol (Figura 21-38). Pequenas quantidades de oxisteróis, como 25-hidroxicolessterol, são formadas no fígado e atuam como reguladores da síntese de colesterol (ver a seguir). Em outros tecidos, o colesterol é convertido em hormônios esteroides (p. ex., no córtex da glândula suprarrenal e nas gônadas; ver Figura 10-18) ou no hormônio vitamina D (no fígado e nos rins; ver Figura 10-19). Esses hormônios são sinalizadores biológicos extremamente potentes agindo por meio de receptores nucleares proteicos.

Os **ácidos biliares**, uma das três formas do colesterol exportadas do fígado, são os principais componentes da bile, um fluido estocado na vesícula biliar e excretado no intestino delgado para auxiliar na digestão de refeições contendo gordura. Os ácidos biliares e seus sais são derivados relativamente hidrofílicos do colesterol e servem como agentes emulsificantes no intestino, convertendo partículas grandes de gordura em pequenas micelas, aumentando,

dessa forma, muito a superfície de interação com as lipases digestivas (ver Figura 17-1). A bile também contém quantidades muito menores de colesterol (colesterol biliar).

Os **ésteres de colesterol** são formados no fígado pela ação da **acil-CoA-colesterol aciltransferase (ACAT)**. Essa enzima catalisa a transferência de um ácido graxo da coenzima A para o grupo hidroxila do colesterol (Figura 21-38), convertendo o colesterol em uma forma mais hidrofóbica e prevenindo que ele entre nas membranas. Os ésteres de colesterol são transportados em partículas lipoproteicas secretadas para outros tecidos que utilizam o colesterol ou são armazenados no fígado em gotículas de gorduras.

0 colesterol e outros lipídeos são transportados em lipoproteínas plasmáticas

O colesterol e os ésteres de colesterol, assim como os triacilgliceróis e os fosfolipídeos, são essencialmente insolúveis em água, porém, ainda assim, devem ser transportados do tecido de origem para os tecidos nos quais eles serão armazenados ou consumidos. Para facilitar seu transporte, eles são transportados no plasma sanguíneo como **lipoproteínas plasmáticas**, que são complexos macromoleculares de proteínas transportadoras específicas, chamadas de **apolipoproteínas**, e várias combinações de fosfolipídeos, colesterol, ésteres de colesterol e triacilgliceróis.

As apolipoproteínas (“apo” designa a proteína em sua forma livre de lipídeo) combinam-se com os lipídeos, formando diversas classes de partículas lipoproteicas, as quais são complexos esféricos com os lipídeos hidrofóbicos no centro e as cadeias laterais hidrofílicas de aminoácidos na superfície (Figura 21-39a). As diferentes combinações de lipídeos e proteínas produzem partículas de diferentes densidades, variando de quilomícrons a lipoproteínas de densidade alta. Essas partículas podem ser separadas por ultracentrifugação (Tabela 21-1) e visualizadas por microscopia eletrônica (Figura 21-39b).

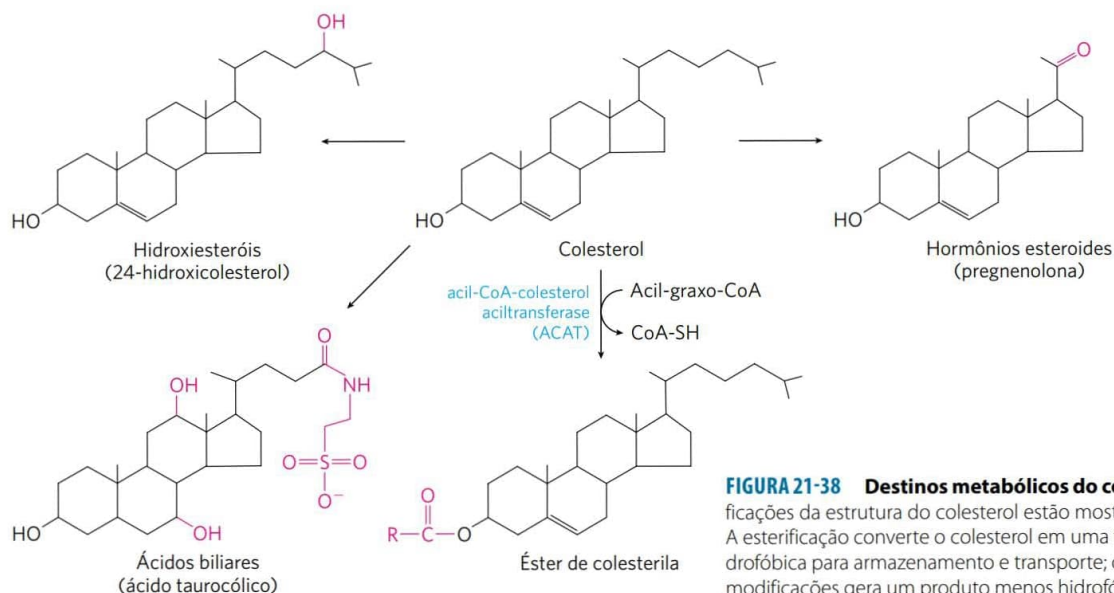


FIGURA 21-38 Destinos metabólicos do colesterol. As modificações da estrutura do colesterol estão mostradas em vermelho. A esterificação converte o colesterol em uma forma ainda mais hidrofóbica para armazenamento e transporte; cada uma das outras modificações gera um produto menos hidrofóbico.

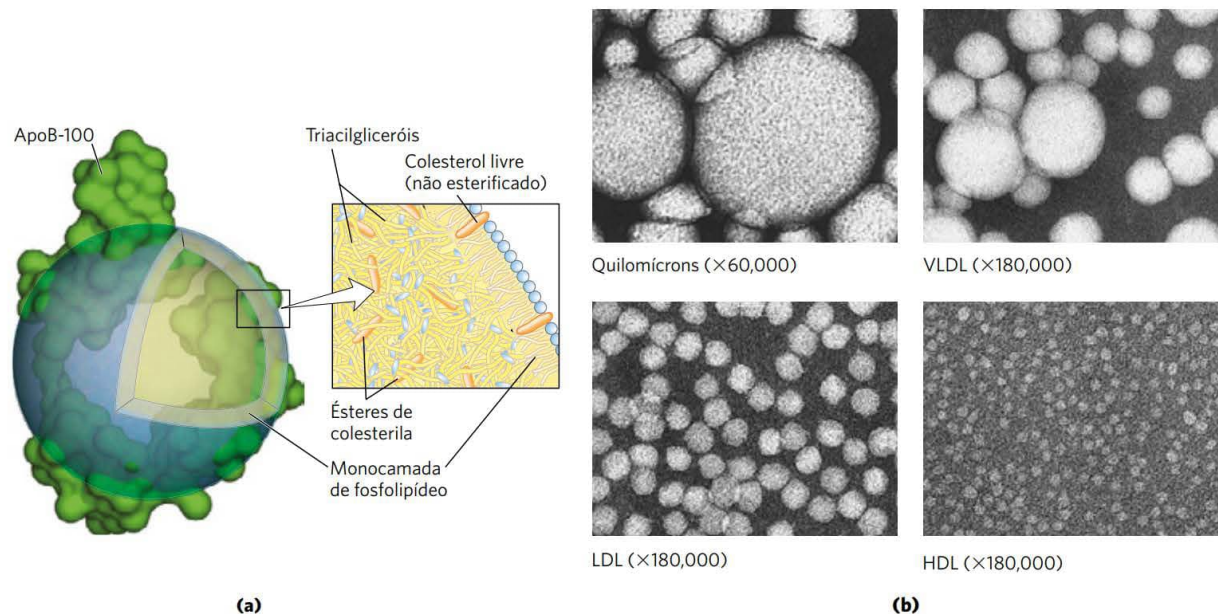


FIGURA 21-39 Lipoproteínas. (a) Estrutura de uma lipoproteína de densidade baixa (LDL). A apolipoproteína B-100 (apoB-100) é uma das maiores cadeias polipeptídicas conhecidas, com 4.636 resíduos de aminoácidos (M , 512.000). Uma partícula de LDL contém um núcleo com aproximadamente 1.500 moléculas de ésteres de colesterol, envolvido por uma camada de cerca de 500 moléculas de colesterol, 800 moléculas de fosfolípidos e uma molécula de apoB-100. (b) Quatro classes de lipoproteínas, visualizadas ao microscópio eletrônico após coloração negativa. No sentido horário, a partir da parte superior à esquerda: quilomícrons, 50 a 200 nm de diâmetro; VLDL, 28 a 70 nm; HDL, 8 a 11 nm; LDL, 20 a 25 nm. Os tamanhos mostrados das partículas são aqueles medidos para essas amostras; os tamanhos das partículas variam consideravelmente em diferentes preparações. Para as propriedades das lipoproteínas, ver Tabela 21-1. [Fontes: (a) ApoB-100 foi modelada utilizando dados de A. Johns et al., *J. Biol. Chem.* 281:19.732, 2006. (b) Robert Hamilton, Jr., PhD.]

Cada classe de lipoproteína tem uma função específica, determinada por seu local de síntese, por sua composição lipídica e por seu conteúdo apolipoproteico. Pelo menos dez apolipoproteínas distintas são encontradas nas lipoproteínas do plasma humano (Tabela 21-2), distinguíveis por seus tamanhos, suas reações com anticorpos específicos e sua distribuição característica nas classes de lipoproteínas. Esses componentes proteicos atuam como sinalizadores, direcionando as lipoproteínas para tecidos específicos ou ativando enzimas que agem nas lipoproteínas. Eles também têm sido envolvidos em doenças; o Quadro 21-2 descreve um elo entre apoE e a doença de Alzheimer. A **Figura 21-40** fornece uma visão geral da formação e do transporte das lipoproteínas em mamíferos. As etapas numeradas na discussão que se segue se referem a esta figura.

Os **quilomícrons**, discutidos no Capítulo 17, quando foi analisado o transporte dos triacilgliceróis da dieta do intestino até os demais tecidos, são as maiores lipoproteínas e as menos densas, contendo alta proporção de triacilgliceróis (ver Figura 17-2). ❶ Os quilomícrons são sintetizados a partir de gorduras da dieta no RE dos enterócitos, células epiteliais que recobrem o intestino delgado. Eles, então, movem-se pelo sistema linfático e entram na corrente sanguínea pela veia subclávia esquerda. As apolipoproteínas dos quilomícrons incluem a apoB-48 (exclusiva dessa classe de lipoproteínas), a apoE e a apoC-II (Tabela 21-2). ❷ A apoC-II ativa a lipase lipoproteica nos capilares do tecido adiposo, do coração, do músculo esquelético e da glândula mamária em lactação, permitindo a liberação de ácidos graxos livres (AGL) para esses tecidos. Os quilomícrons,

TABELA 21-1 Principais classes de lipoproteínas plasmáticas humanas: algumas propriedades

Lipoproteína	Densidade (g/mL)	Composição (% do peso)				
		Proteína	Fosfolípidos	Colesterol livre	Ésteres de colesterol	Triacilgliceróis
Quilomícrons	< 1,006	2	9	1	3	85
VLDL	0,95-1,006	10	18	7	12	50
LDL	1,006-1,063	23	20	8	37	10
HDL	1,063-1,210	55	24	2	15	4

Fonte: dados obtidos de D. Kritchevsky, *Nutr. Int.* 2:290, 1986.

TABELA 21-2 Apolipoproteínas das lipoproteínas plasmáticas humanas

Apolipoproteína	Peso molecular do polipeptídeo	Associação a lipoproteínas	Função (quando conhecida)
ApoA-I	28.100	HDL	Ativa a LCAT; interage com transportadores ABC
ApoA-II	17.400	HDL	Inibe a LCAT
ApoA-IV	44.500	Quilomícron, HDL	Ativa a LCAT; transporte/depuração de colesterol
ApoB-48	242.000	Quilomícron	Transporte/depuração de colesterol
ApoB-100	512.000	VLDL, LDL	Liga-se a receptores de LDL
ApoC-I	7.000	VLDL, HDL	
ApoC-II	9.000	Quilomícron, VLDL, HDL	Ativa a lipase lipoproteica
ApoC-III	9.000	Quilomícron, VLDL, HDL	Inibe a lipase lipoproteica
ApoD	32.500	HDL	
ApoE	34.200	Quilomícron, VLDL, HDL	Desencadeia a depuração de VLDL e de remanescentes de quilomícron
ApoH	50.000	Possivelmente VLDL, liga fosfolípidos, como a cardiolipina	Papéis na coagulação, metabolismo lipídico, apoptose, inflamação

Fonte: informação de D. E. Vance e J. E. Vance (eds), *Biochemistry of Lipids and Membranes*, 5ª edição, Elsevier Science Publishing, 2008.

portanto, transportam os lipídeos da dieta para os tecidos onde eles serão consumidos ou armazenados como combustível. ❸ Os remanescentes dos quilomícrons (o que resta após perderem a maior parte de seus triacilgliceróis, mas contendo ainda colesterol, apoE e apoB-48) movem-se pela corrente sanguínea para o fígado. Receptores existentes no fígado ligam a apoE dos remanescentes dos quilomícrons e medeiam sua captação por endocitose. ❹ No fígado, os remanescentes liberam seu colesterol e são degradados nos lisossomos. Essa via do colesterol da dieta até o fígado é a **via exógena** (setas azuis na Figura 21-40).

Quando a dieta contém mais ácidos graxos e colesterol do que a quantidade necessária para uso imediato como combustível ou como precursores de outras moléculas, eles são ❺ convertidos em triacilgliceróis ou ésteres de colesterol no fígado e empacotados com apolipoproteínas espe-

cíficas, formando as **lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL)**, do inglês, *very-low density lipoproteins*). O excesso de carboidratos na dieta também pode ser convertido em triacilgliceróis no fígado e exportado como VLDL. Além dos triacilgliceróis e dos ésteres de colesterol, as VLDL contêm apoB-100, apoC-I, apoC-II, apoC-III e apoE (Tabela 21-2). As VLDL são transportadas pelo sangue do fígado para o músculo e o tecido adiposo. ❻ Nos capilares desses tecidos, apoC-II ativa a lipase lipoproteica, que catalisa a liberação dos ácidos graxos a partir dos triacilgliceróis das VLDL. Os adipócitos captam esses ácidos graxos, reconvertem-nos em triacilgliceróis e armazenam os produtos em gotículas intracelulares de lipídeos; já os miócitos, ao contrário, primariamente oxidam esses ácidos graxos para obterem energia. Quando o nível de insulina está alto (após uma refeição), as VLDL atuam principalmente para trans-

QUADRO 21-2**MEDICINA****Alelos da ApoE predizem incidência da doença de Alzheimer**

Há três variantes (alelos) comuns para os genes que codificam a apolipoproteína E na população humana. A mais comum, compreendendo cerca de 78% dos alelos humanos de apoE, é a *APOE3*; os alelos *APOE4* e *APOE2* perfazem, respectivamente, 15 e 7%. O alelo *APOE4* é particularmente comum em seres humanos com a doença de Alzheimer, e a associação é altamente preditiva. As pessoas que herdam o alelo *APOE4* têm um risco aumentado de apresentarem a doença de Alzheimer de desenvolvimento tardio. Aquelas homozigotas para *APOE4* têm o risco de desenvolver a doença aumentado em 16 vezes; para aquelas que a desenvolvem, a idade média do início da doença é pouco abaixo dos 70 anos. Para aquelas pessoas que herdam duas cópias de *APOE3*, ao contrário, a média de idade do início da doença de Alzheimer excede os 90 anos.

A base molecular para a associação entre a apoE-4 e a doença de Alzheimer ainda não é conhecida. Também não está claro como a apoE-4 pode afetar a deposição de fibras amiloides, que parecem ser o principal agente causador da doença (ver Figura 4-32). Especula-se acerca de um possível papel da apoE-4 na estabilização da estrutura do citoesqueleto dos neurônios. As proteínas apoE-2 e apoE-3 ligam-se a certas proteínas associadas com os microtúbulos neuronais, ao passo que apoE-4 não o faz. Isso pode acelerar a morte dos neurônios. Seja qual for o mecanismo que venha a ser confirmado, essas observações prometem expandir nosso conhecimento das funções biológicas das apolipoproteínas.

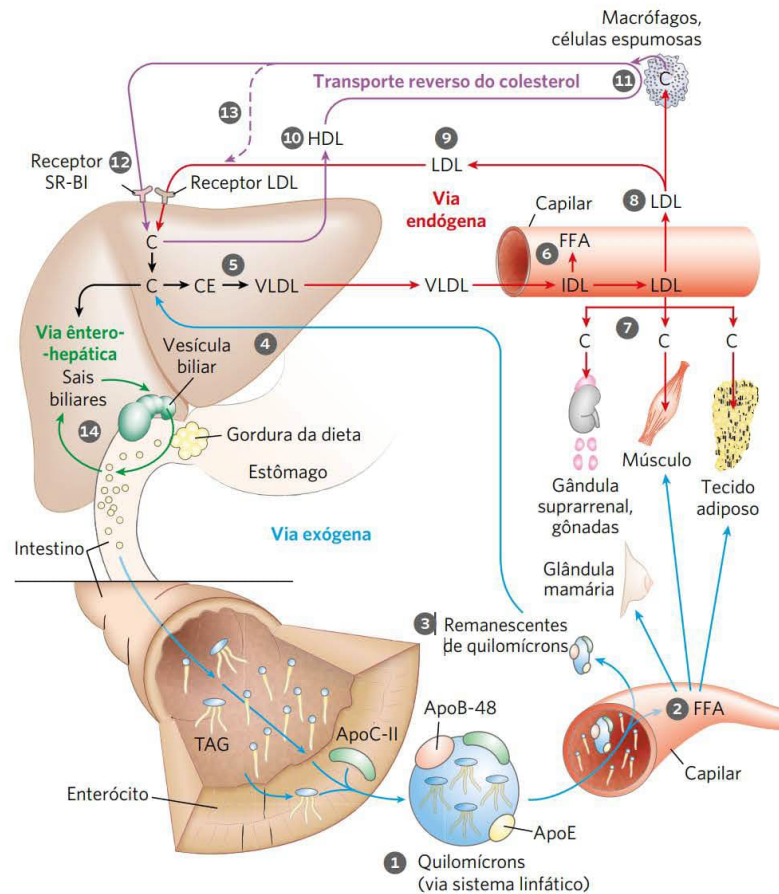


FIGURA 21-40 Lipoproteínas e transporte dos lipídeos. Os lipídeos são transportados na corrente sanguínea como lipoproteínas, existentes em diversas formas variantes, cada uma com uma função própria e com composições lipídica e proteica distintas (ver Tabelas 21-1 e 21-2), portanto, com densidades diferentes. As etapas numeradas estão descritas no texto. Na via exógena (setas azuis), os lipídeos da dieta são empacotados em quilomírons; os ácidos graxos de seus triacilgliceróis (TAG) são liberados pela lipase lipoproteica nos tecidos adiposo e muscular durante o transporte ao longo dos capilares. Os quilomírons remanescentes (contendo na maior parte proteínas e colesterol) são captados pelo fígado. Os sais biliares produzidos no fígado auxiliam na dispersão das gorduras da dieta e são, após, reabsorvidos na via entero-hepática (setas verdes). Na via endógena (setas vermelhas), os lipídeos sintetizados ou empacotados no fígado são distribuídos aos tecidos periféricos pela VLDL. A remoção dos lipídeos da VLDL (acompanhada pela perda de parte das apolipoproteínas) converte, gradualmente, parte da VLDL em LDL, que transporta o colesterol para os tecidos extra-hepáticos ou de volta para o fígado. O excesso de colesterol nos tecidos extra-hepáticos é transportado de volta ao fígado como HDL pelo transporte reverso do colesterol (setas roxas). C representa colesterol; CE, éster de colesterol.

portar lipídeos da dieta para o tecido adiposo para armazenamento. No jejum entre refeições, os ácidos graxos usados para produzir as VLDL no fígado são originários principalmente do tecido adiposo, e o principal alvo das VLDL são os miócitos do coração e do músculo esquelético.

A perda de triacilgliceróis converte parte da VLDL em remanescentes de VLDL, também chamadas de lipoproteínas de densidade intermediária (IDL, do inglês, *intermediate density lipoproteins*). A remoção adicional de triacilgliceróis da IDL (remanescentes) produz **lipoproteínas de densidade baixa (LDL)**, do inglês, *low-density lipoproteins*). Rica em colesterol e ésteres de colesterol e contendo apoB-100 como sua principal apolipoproteína, a LDL transporta colesterol para os tecidos extra-hepáticos, como músculo, glândulas suprarrenais e tecido adiposo. Esses tecidos têm receptores para LDL na membrana plasmática que reconhecem a apoB-100 e medeiam a captação de colesterol e ésteres de colesterol. 8 A LDL

também entrega colesterol para os macrófagos, algumas vezes os convertendo em células espumosas (ver Figura 21-46). 9 A LDL não captada pelos tecidos periféricos retorna ao fígado, onde é captada via **receptores de LDL** na membrana plasmática dos hepatócitos. O colesterol que entra no hepatócito por essa via pode ser incorporado nas membranas, convertido em ácidos biliares ou reesterificado pela ACAT (Figura 21-38) para armazenamento nas gotículas lipídicas citosólicas. Essa via, da formação de VLDL no fígado ao retorno de LDL para o fígado, é a **via endógena** do metabolismo e transporte do colesterol (setas vermelhas na Figura 21-40). O acúmulo do excesso de colesterol intracelular é prevenido pela diminuição da velocidade de síntese quando colesterol suficiente está disponível a partir de LDL no sangue. Mecanismos regulatórios desse processo são descritos a seguir. Retornaremos à Figura 21-40 e a outras vias do transporte de lipoproteínas após discutirmos a captação de LDL pelas células.

Os ésteres de colesterol entram nas células por endocitose mediada por receptor

Cada partícula de LDL na corrente sanguínea contém apoB-100, a qual é reconhecida por receptores de LDL presentes na membrana plasmática de células que precisam captar colesterol. A **Figura 21-41** mostra uma dessas células. ❶ Os receptores para LDL são sintetizados no retículo endoplasmático e transportados para a membrana plasmática após modificação no complexo de Golgi. Uma vez na membrana plasmática, eles tornam-se disponíveis para a ligação à apoB-100. ❷ A ligação da LDL ao receptor de LDL inicia a endocitose, que ❸ transfere a LDL e o seu receptor para o interior da célula dentro de um endossomo. ❹ As porções da membrana do endossomo que contêm o receptor brotam da membrana e os receptores retornam à superfície celular, a fim de funcionar de novo na captação de LDL. ❺ O endossomo funde-se com um lisossomo, o qual ❻ contém enzimas que hidrolisam os ésteres de colesterol, liberando colesterol e ácidos graxos no citosol. A proteína apoB-100 também é degradada em aminoácidos, liberados para o citosol. A apoB-100 também está presente na VLDL, mas o seu domínio de ligação ao receptor não está disponível para a interação com o receptor de LDL; a conversão de VLDL em LDL expõem o domínio de ligação ao receptor da apoB-100.



Essa via para o transporte de colesterol no sangue e sua **endocitose mediada por receptor** nos tecidos-alvo foi elucidada por Michael Brown e Joseph Goldstein. Eles descobriram que indivíduos com a doença genética **hipercolesterolemia familiar (HF)** têm mutações no receptor de LDL que previnem a captação normal

de LDL pelo fígado e pelos tecidos periféricos. O resultado da captação defeituosa de LDL são níveis muito altos de LDL no sangue (e de colesterol que ela carrega). Indivíduos com HF têm probabilidade muito aumentada de desenvolver aterosclerose, doença do sistema circulatório em que os vasos sanguíneos são ocluídos por placas ricas em colesterol (ver Figura 21-46).



Michael Brown e Joseph Goldstein
[Fonte: Mei-Chun Jau. Cortesia de Michael Brown e Joseph Goldstein, University of Texas Southwestern Medical Center.]

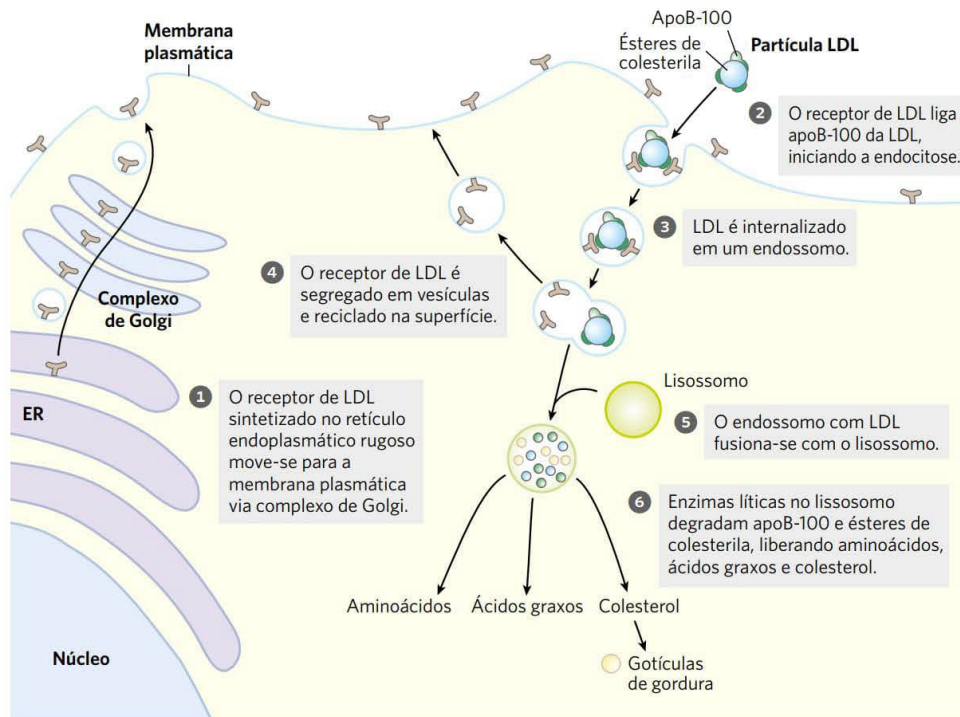


FIGURA 21-41 Captação do colesterol por endocitose mediada por receptor.

A doença de **Niemann-Pick do tipo C (NPC)** resulta de um defeito hereditário no armazenamento de lipídeos. Nessa doença, o colesterol não é transportado para fora dos lisossomos e, assim, acumula-se nos lisossomos do fígado, no encéfalo e nos pulmões, levando à morte prematura. A NPC é o resultado de uma mutação em um de dois genes (*NPC1* e *NPC2*) essenciais para mover o colesterol para fora do lisossomo e para o citosol, onde ele pode ser metabolizado. O gene *NPC1* codifica uma proteína lisossomal transmembrana, e o *NPC2*, uma proteína solúvel. Essas proteínas atuam em sequência para transferir colesterol para fora do lisossomo e para o citosol para processamento adicional ou metabolismo. ■

A HDL realiza o transporte reverso de colesterol

A quarta das principais lipoproteínas em mamíferos, a **lipoproteína de densidade alta (HDL, do inglês, *high-density lipoprotein*)**, ¹⁰ origina-se no fígado e no intestino delgado como pequenas partículas ricas em proteína que contêm relativamente pouco colesterol e não contêm ésteres de colesterila (todos os números das etapas referem-se à Figura 21-40). As HDL contêm principalmente apoA-I e outras apolipoproteínas (Tabela 21-2). Elas também contêm a enzima **lecitina-colesterol-aciltransferase (LCAT)**, que catalisa a formação de ésteres de colesterila a partir de lecitina (fosfatidilcolina) e de colesterol (**Figura 21-42**). A LCAT na superfície das partículas de HDL nascentes (recentemente formadas) converte o colesterol e a fosfatidilcolina dos remanescentes de quilomícrons e de VLDL encontrados na corrente sanguínea em ésteres de colesterila, dando início à formação do núcleo da HDL, transformando a HDL nascente, que tem forma de disco, em uma partícula de HDL madura de forma esférica. ¹¹ A HDL nascente também pode captar colesterol de células extra-hepáticas ricas em colesterol (inclusive de macrófagos e de células espumosas formadas a partir de macrófagos; ver a seguir). ¹² A HDL madura, então, retorna ao fígado, onde o colesterol é descarregado por meio do receptor (removedor ou *scavenger*) SR-BI. ¹³ Parte dos ésteres de colesterila no HDL também pode ser transferida ao LDL pela proteína transportadora de éster de colesterila. O circuito da HDL é o **transporte reverso do colesterol** (setas roxas na Figura 21-40). Boa parte desse colesterol é convertida em sais biliares por enzimas dos peroxissomos hepáticos; os sais biliares são armazenados na vesícula biliar e liberados no intestino quando uma refeição é digerida. ¹⁴ Os sais biliares são reabsorvidos, retornam ao fígado e recirculam pela vesícula biliar na **circulação entero-hepática** (setas verdes na Figura 21-40).

O mecanismo pelo qual o esteroide é descarregado no fígado e em outros tecidos via receptor SR-BI não envolve endocitose, o mecanismo usado para captação de LDL. Em vez disso, quando HDL se liga aos receptores SR-BI na membrana plasmática dos hepatócitos ou de tecidos esteroideogênicos, como a glândula suprarrenal, esses receptores medeiam a transferência parcial e seletiva do colesterol e de outros lipídeos do HDL para a célula. A HDL descarregada, então, dissocia-se e recircula na corrente sanguínea para extrair mais lipídeos dos remanescentes de quilomícrons e VLDL e de células sobrecarregadas com colesterol, como descrito a seguir.

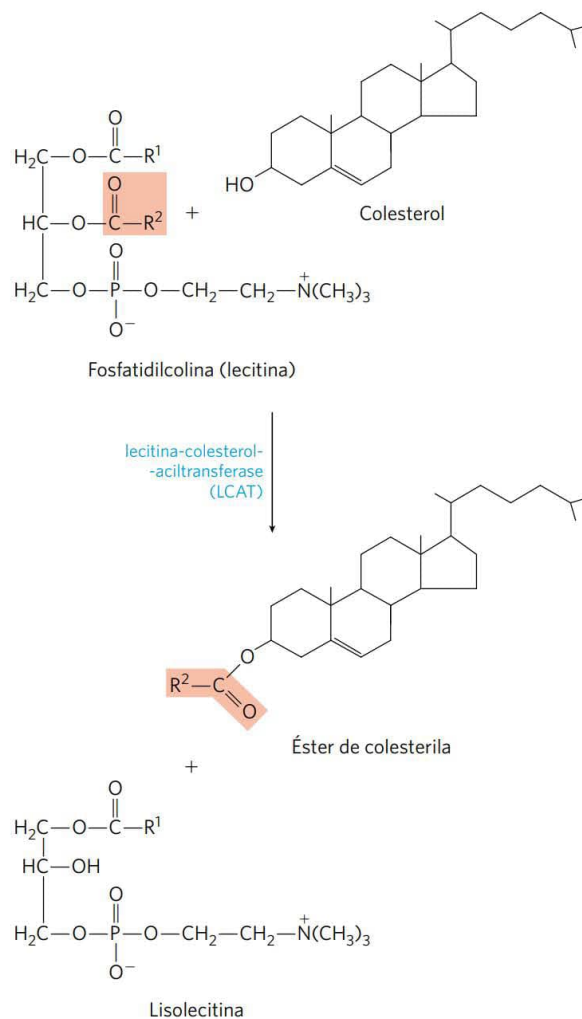


FIGURA 21-42 A reação catalisada pela lecitina-colesterol-aciltransferase (LCAT). Essa enzima está presente na superfície da HDL e é estimulada pelo componente apoA-I da HDL. Os ésteres de colesterila acumulam-se nas HDL nascentes, convertendo-as em HDL maduras.

A síntese e o transporte do colesterol são regulados em vários níveis

A síntese de colesterol é um processo complexo e grande consumidor de energia. O excesso de colesterol não pode ser catabolizado para o uso como combustível, e deve, por conseguinte, ser excretado. Portanto, é claramente vantajoso para um organismo regular a biossíntese de colesterol para complementar a quantidade ingerida na dieta. Nos mamíferos, a produção do colesterol é regulada pela concentração intracelular de colesterol, pelo suprimento de ATP e pelos hormônios glucagon e insulina. A etapa comprometida na via de síntese do colesterol (e o principal local de regulação) é a conversão de HMG-CoA em mevalonato (Figura 21-34), a reação catalisada pela HMG-CoA-redutase.

A regulação de curto prazo da *atividade* da HMG-CoA-redutase existente é realizada por modificação covalente reversível – fosforilação pela proteína-cinase dependente de

AMP (AMPK), sensível à alta concentração de AMP (indicando baixa concentração de ATP). Assim, quando os níveis de ATP declinam, a síntese de colesterol desacelera, e as vias catabólicas para a geração de ATP são estimuladas (Figura 21-43). Os hormônios que controlam a regulação global do metabolismo de lipídeos e carboidratos também atuam sobre a HMG-CoA-redutase; o glucagon estimula a sua fosforilação (inativação), e a insulina promove a desfosforilação, ativando a enzima e favorecendo a síntese de colesterol. Esses mecanismos regulatórios covalentes provavelmente não são tão importantes quantitativamente como os mecanismos que afetam a síntese e a degradação da enzima.

Em longo prazo, o número de moléculas de HMG-CoA-redutase aumenta ou diminui em resposta às concentrações celulares de colesterol. A regulação da síntese de HMG-CoA-redutase pelo colesterol é mediada por um sistema elegante de regulação da transcrição do gene dessa enzima (Figura 21-44). Esse gene, junto com mais de 20 outros genes que codificam enzimas que atuam na captação e na síntese do colesterol e dos ácidos graxos insaturados, é controlado por uma pequena família de proteínas, chamadas de **proteínas de ligação aos elementos reguladores de esterol (SREBP; do inglês, Sterol Regulatory element-binding proteins)**. Quando recém-sintetizadas, essas proteínas estão inseridas no RE. Apenas o fragmento solúvel do domínio regulatório de uma SREBP atua como ativador da transcrição gênica, utilizando mecanismos discutidos no Capítulo 28. Quando os níveis de colesterol e oxiesterol estão altos, as SREBP são mantidas no RE e complexadas com outra proteína, chamada de **proteína ativadora da clivagem da SREBP (SCAP; do inglês, SREBP cleavage-activating protein)**, que, por sua vez, está ancorada à membrana do RE por sua interação com uma terceira proteína de membrana, a proteína induzida por in-

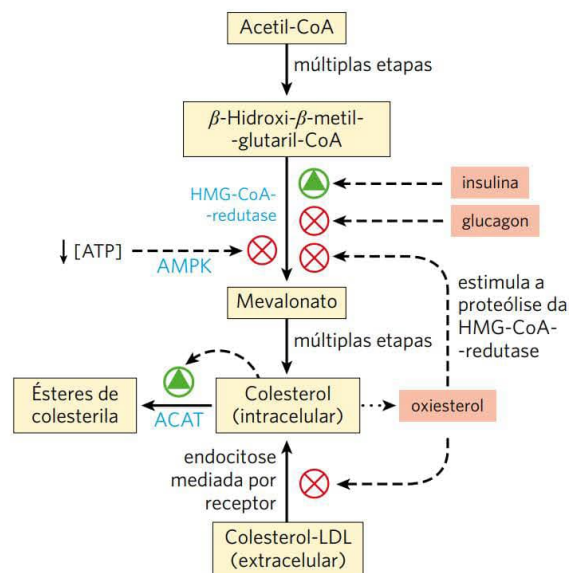


FIGURA 21-43 A regulação da formação de colesterol equilibra a sua síntese com a captação a partir da alimentação e o estado energético. A insulina promove a desfosforilação (ativação) da HMG-CoA-redutase; o glucagon promove sua fosforilação (inativação); e a proteína-quinase dependente de AMP, AMPK, quando ativada por baixa [ATP] em relação à [AMP], a fosforila, inativando-a. Oxiesteróis metabólitos do colesterol (p. ex., 24(S)-hidroxicoolesterol) estimulam a proteólise da HMG-CoA-redutase.

sulina **Insig** (do inglês, *insulin-induced gene protein*) (Figura 21-44a). A SCAP e a Insig atuam como sensores de esterol. Quando os níveis de esteróis estão altos, o complexo Insig-SCAP-SREBP permanece retido na membrana do

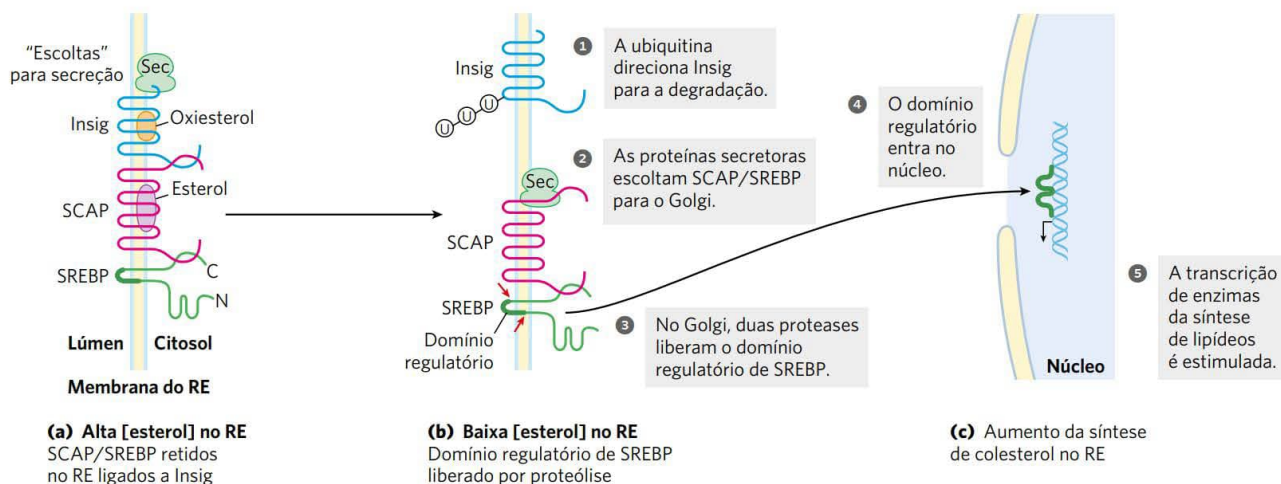


FIGURA 21-44 Regulação da síntese de colesterol por SREBP. As proteínas de ligação aos elementos reguladores de esterol (SREBP, mostradas em verde) estão embutidas na RE quando recém-sintetizadas, complexadas com a proteína ativadora da clivagem de SREBP (SCAP, em vermelho), que, por sua vez, está ligada à Insig (em azul). (N e C representam as extremidades amino e carboxila das proteínas.) (a) Quando ligadas à SCAP e à Insig, as SREBP estão inativas. (b) Quando os níveis de esterol diminuem, os sítios de ligação a esterol na Insig e na SCAP estão desocupados, o complexo migra para o complexo de Golgi e a SREBP é clivada (setas vermelhas), gerando um fragmento do domínio regulatório. (c) Este domínio age no núcleo, aumentando a transcrição de genes regulados por esterol. Insig é direcionada para degradação pela ligação de várias moléculas de ubiquitina. [Fonte: informação de R. Raghow et al., *Trends Endocrinol. Metab.* 19:65, 2008, Fig. 2.]

RE. Quando os níveis de esteróis declinam na célula (Figura 21-44b), o complexo SCAP-SREBP é levado ao complexo de Golgi por proteínas secretoras. Ali, duas clivagens proteolíticas da SREBP liberam um fragmento regulador, que migra para o núcleo e ativa a transcrição de seus genes-alvo, incluindo aqueles para a HMG-CoA-redutase, a proteína receptora de LDL e outras proteínas necessárias para a síntese de lipídeos. Quando os níveis de esteróis aumentam suficientemente, a liberação proteolítica do domínio aminoterminal da SREBP é novamente bloqueada, e a degradação proteossômica do domínio ativo existente resulta em rápido desligamento dos genes-alvos.

Em longo prazo, o nível da HMG-CoA-redutase também é regulado por degradação proteolítica da enzima. Altos níveis de colesterol celular são detectados pela Insig, que dispara o acoplamento de moléculas de ubiquitina à HMG-CoA-redutase, levando à sua degradação pelo proteassomo (ver Figura 27-50).

O **receptor hepático X (RXH)** é um fator de transcrição nuclear ativado por ligantes oxisteróis (refletindo os altos níveis de colesterol), que integra o metabolismo dos ácidos graxos, dos esteróis e da glicose. $RHX\alpha$ é expresso principalmente no fígado, no tecido adiposo e nos macrófagos; $RHX\beta$ está presente em todos os tecidos. Quando ligado a um oxisterol, os RXH formam heterodímeros com um segundo tipo de receptor nuclear, os **receptores X de retinóides (RXR)**, e o dímero RXH-RXR ativa a transcrição de um grupo de genes (Figura 21-45) incluindo aquele da acetil-CoA-carboxilase (a primeira enzima da síntese dos ácidos graxos); da ácido graxo-sintase; da enzima do citocromo P-450 CYP7A1, necessária para conversão de esterol em ácido biliar; das apoproteínas envolvidas no transporte de colesterol (apoC-I, apoC-II, apoD e apoE); dos transportadores ABC ABCA1 e ABCG1, envolvidos no transporte reverso do colesterol (ver a seguir); de GLUT4, o transportador de glicose estimulado por insulina no músculo e no tecido adiposo; e de uma SREBP chamada SREBP1C. Os reguladores transcricionais RXH e SREBP, portanto, trabalham juntos para alcançar e manter a homeostasia do colesterol; as SREBP são ativadas por baixos níveis de colesterol celular, e os RXH são ativados por altos níveis de colesterol.

A regulação realizada pelos RXH é complementada pela atividade do **receptor farnesoide X (FXR)**, que também forma um heterodímero com RXH, com um efeito frequentemente recíproco ao de RXH-RXH. Embora o farnesol seja um ligante para este receptor, o FXR responde primariamente aos ácidos biliares. Níveis altos de ácidos biliares podem ser tóxicos. O FXR é expresso principalmente no intestino, no fígado, nos rins e nas glândulas suprarrenais. Ele fornece um controle essencial dos níveis de ácidos biliares pelo aumento ou pela redução da expressão de múltiplos genes. Por exemplo, o RXH ativa a transcrição da enzima citocromo P-450 CYP7A1, que promove a formação de ácidos biliares a partir de esteróis. O FXR reprime a transcrição de CYP7A1 quando os níveis dos ácidos biliares estão altos.

Por fim, dois outros mecanismos regulatórios influenciam o nível de colesterol celular: (1) altas concentrações

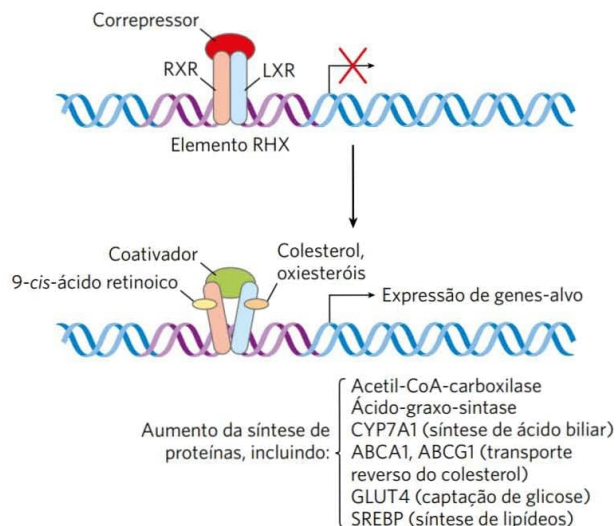


FIGURA 21-45 Atuação do dímero RXR-RXH sobre a expressão de genes do metabolismo de lipídeos e da glicose. Quando seus ligantes estão ausentes, RXR e RXH associam-se a uma proteína correpressora, prevenindo a transcrição dos genes associados ao elemento do RXH (RXHE). Quando os seus respectivos ligantes estão presentes (9-*cis*-ácido retinoico para RXR; colesterol ou oxisteróis para RXH), o dímero dissocia-se do correpressor e, então, associa-se a uma proteína coativadora. Este complexo se liga ao elemento RXH e aciona a expressão dos genes associados. A regulação da expressão gênica é um tópico discutido em mais detalhes no Capítulo 28. [Fonte: informação obtida de A. C. Calkin e P. Tontonoz, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 13:213, 2012, Fig. 1.]

intracelulares de colesterol ativam a ACAT, que aumenta a esterificação do colesterol para o armazenamento, e (2) o alto nível de colesterol celular diminui (via SREBP) a transcrição do gene que codifica o receptor de LDL, reduzindo a produção do receptor e, assim, a captação de colesterol do sangue.

A desregulação do metabolismo do colesterol pode levar à doença cardiovascular



Como observado anteriormente, o colesterol não pode ser metabolizado pelas células animais. O excesso de colesterol pode apenas ser removido por excreção ou por conversão em sais biliares. Quando a soma do colesterol sintetizado e do colesterol obtido na dieta excede a quantidade necessária para a síntese de membranas, sais biliares e esteróis, o acúmulo patológico de colesterol (placas) pode obstruir os vasos sanguíneos, condição chamada de **aterosclerose**. A falência cardíaca devida à oclusão das artérias coronárias é uma das principais causas de morte nas sociedades industrializadas. A aterosclerose está relacionada a altos níveis de colesterol no sangue e particularmente a altos níveis de colesterol LDL (“mau colesterol”); existe uma correlação *negativa* entre o nível de HDL (“bom colesterol”) e a doença arterial. A formação de placa nos vasos sanguíneos é iniciada quando a LDL contendo grupos acil-graxo parcialmente oxidados adere e se acumula na matriz extracelular das células epiteliais que revestem as arté-

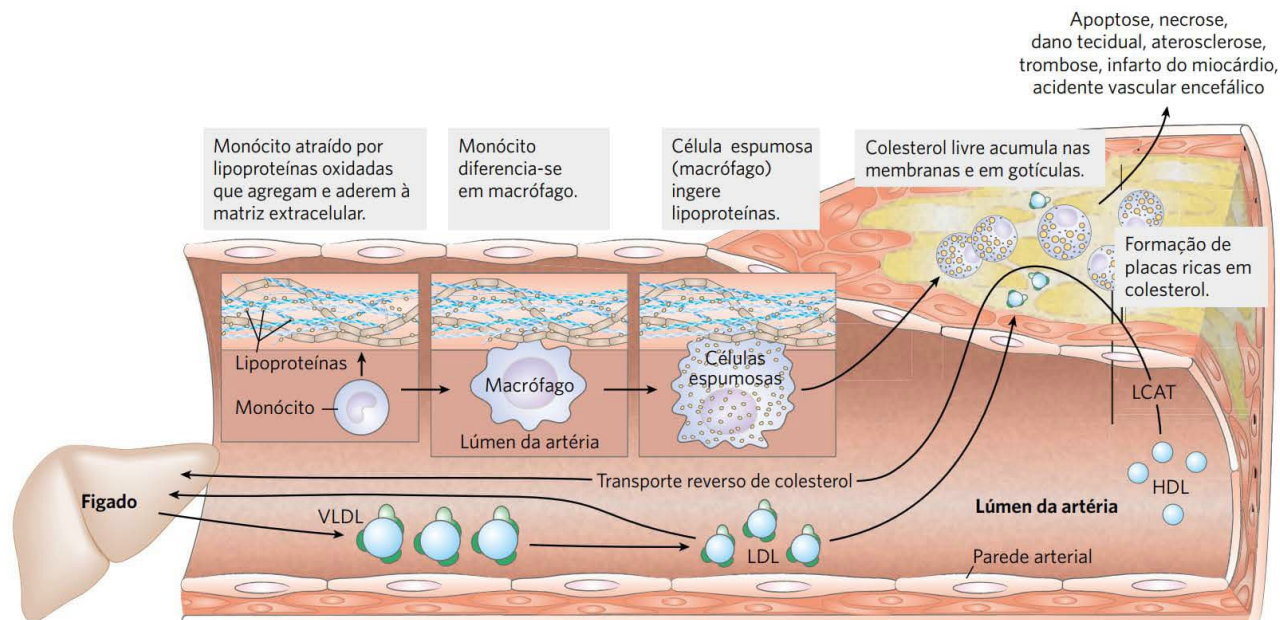


FIGURA 21-46 Formação de placas ateroscleróticas. O excesso de lipídeos dietéticos é depositado nas paredes das artérias, um processo facilitado pela conversão de monócitos em células espumosas e pela incorporação das células espumosas em placas crescentes. Parte dessa deposição é contrabalançada pelas HDL e o transporte reverso de colesterol. A reação da LCAT é mostrada na Figura 21-42.

rias (**Figura 21-46**). As células do sistema imune (monócitos) são atraídas para a região onde há acúmulo de LDL, e elas se diferenciam em macrófagos, que captam o LDL oxidado e o colesterol que eles contêm. Os macrófagos não limitam sua captação de esteróis, e, com o aumento do acúmulo de ésteres de colesterol e colesterol livre, os macrófagos tornam-se **células espumosas** (parecem espuma ao microscópio). Com o acúmulo de colesterol livre nas células espumosas e em suas membranas, elas sofrem apoptose. Ao longo do tempo, as artérias tornam-se progressivamente ocluídas, já que as placas, consistindo em material da matriz extracelular, tecido cicatricial formado por tecido muscular liso, e restos de células espumosas gradualmente se tornam maiores. De modo ocasional, uma placa se solta do local de sua formação e é transportada pelo sangue para uma região mais estreita de uma artéria no encéfalo ou no coração, causando o acidente vascular cerebral ou infarto do miocárdio.

Na hipercolesterolemia familiar, os níveis de colesterol sanguíneo são extremamente elevados e uma aterosclerose grave desenvolve-se na infância. Essas pessoas têm o receptor de LDL defeituoso e não apresentam a captação mediada por receptor do colesterol transportado pela LDL. Como consequência, o colesterol não é retirado do sangue; ele acumula-se nas células espumosas e contribui para a formação das placas ateroscleróticas. A síntese do colesterol endógeno continua, apesar da quantidade excessiva de colesterol no sangue, já que o colesterol extracelular não pode entrar nas células para regular a síntese intracelular (**Figura 21-44**). Uma classe de fármacos, denominados **estatinas**, alguns deles isolados de fontes naturais e alguns sintetizados industrialmente, é usada para tratar pacientes com colesterol sérico elevado em função de hipercolesterolemia familiar e de outras condições. As estatinas assemelham-se

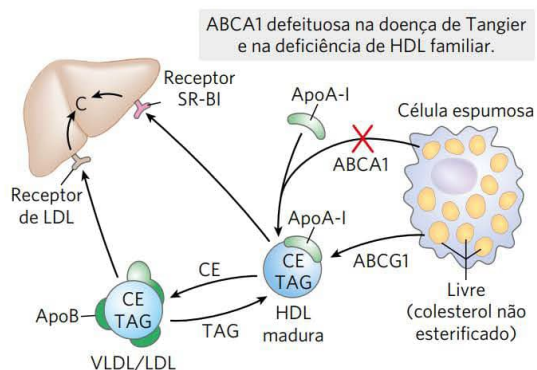
ao mevalonato (**Quadro 21-3**) e são inibidores competitivos da HMG-CoA-redutase.

Uma abordagem alternativa para o controle dos níveis séricos de colesterol é a ativação de RXR, que tem o efeito geral de reduzir a absorção de colesterol e promover sua excreção. Esse é o modo de ação de um fármaco chamado ezetimiba. Uma vez que a ativação do RXR também ativa SREBP1C, causando aumento na produção hepática de ácidos graxos e triacilgliceróis, novas classes de fármacos que atinjam apenas os RXR intestinais estão sendo desenvolvidas. ■

O transporte reverso do colesterol por HDL se opõe à formação da placa e da aterosclerose

O HDL tem um papel crucial na via do transporte reverso do colesterol (**Figura 21-47**), reduzindo o potencial dano causado pela formação das células espumosas. O HDL inicial (com baixo nível de colesterol) captura o colesterol armazenado nos tecidos extra-hepáticos (incluindo de células espumosas em placas nascentes) e o transporta para o fígado.

O movimento do colesterol para fora das células requer transportadores. O genoma humano codifica 48 transportadores da classe ABC (*ATP-binding cassette*), e cerca de metade deles promove o transporte de lipídeos. Dois deles transportam colesterol para fora das células. Neste processo, a apoA-I interage com o transportador ABCA1 em uma célula rica em colesterol. ABCA1 transporta uma fração do colesterol de dentro da célula para a superfície externa da membrana plasmática, onde apoA-I livre de lipídeos ou pobre em lipídeos o captura e o transporta para o fígado. Outro transportador ABC (ABCG1) interage com HDL madura, facilitando o movimento do colesterol para fora da célula



e para a HDL. Esse processo de efluxo é particularmente crucial para o transporte reverso do colesterol para fora das

FIGURA 21-47 O transporte reverso do colesterol. ApoA-I e HDL captam o excesso de colesterol (C) das células periféricas, com a participação dos transportadores ABCA1 e ABCG1 e retornam para o fígado. Em indivíduos com defeito genético em ABCA1, a falha no transporte reverso de colesterol leva a doenças cardiovasculares precoces e graves: doença de Tangier e doença da deficiência de HDL familiar. CE, ésteres de colesterol; TAG, triacilgliceróis. [Fonte: informação obtida de A. R. Tall et al, *Cell Metab.* 7:365, 2008, Fig. 1.]

células espumosas no local das placas que se formam nos vasos sanguíneos de indivíduos com doença cardiovascular.



Na **deficiência de HDL familiar**, os níveis de HDL são muito baixos; e na **doença de Tangier**, eles são quase indetectáveis (Figura 21-47). Essas duas doenças genéticas são o resultado de mutações na proteína ABCA1. A apoA-I na HDL sem colesterol não pode captar colesterol das células carentes da proteína ABCA1, e a apoA-I e a HDL

QUADRO 21-3



MEDICINA

A hipótese lipídica e o desenvolvimento das estatinas

A doença cardíaca coronariana é a principal causa de morte nos países desenvolvidos. As artérias coronárias que trazem o sangue para o coração sofrem um estreitamento devido à formação de depósitos de gordura, chamados de placas ateroscleróticas (contendo colesterol, proteínas fibrosas, depósitos de cálcio, plaquetas sanguíneas e restos celulares). O estabelecimento da conexão entre oclusão arterial (aterosclerose) e níveis de colesterol no sangue foi um projeto do século XX, estimulando uma disputa que foi resolvida apenas com o desenvolvimento de fármacos efetivos na redução do colesterol. O Framingham Heart Study (Estudo do coração de Framingham), estudo longitudinal iniciado em 1948 e em continuidade ainda hoje, tem como objetivo identificar os fatores relacionados com doença cardiovascular. Cerca de 5 mil participantes da cidade de Framingham, Massachusetts, foram submetidos a exames físicos periódicos e entrevista sobre o estilo de vida. Em 2002, participantes da terceira geração foram incluídos no estudo. Esse estudo monumental levou à identificação de fatores de risco para doenças cardiovasculares, incluindo tabagismo, obesidade, sedentarismo, diabetes, pressão arterial alta e alto nível de colesterol no sangue.

Em 1913, N. N. Anitschkov, patologista experimental em São Petersburgo, Rússia, publicou um estudo mostrando que coelhos alimentados com dieta rica em colesterol desenvolviam lesões muito semelhantes às placas ateroscleróticas observadas em seres humanos idosos. Anitschkov continuou seu trabalho ao longo das décadas seguintes, publicando-o em jornais importantes do ocidente. No entanto, seu trabalho não foi aceito como um modelo para a aterosclerose humana, devido ao predomínio do ponto de vista de que a doença era uma simples consequência da idade e que não poderia ser prevenida. A ligação entre colesterol sérico e aterosclerose (a hipótese lipídica) foi gradualmente ganhando força, até que alguns pesquisadores, na década de 1960, sugeriram abertamente que a intervenção terapêutica poderia ser útil. A controvérsia persistiu até a publicação, em 1984, dos resultados de um grande estudo sobre a redução do colesterol, patrocinado

pelo National Institutes of Health dos Estados Unidos, a tentativa primária para a prevenção de doenças coronarianas. Esse estudo mostrou de modo conclusivo uma diminuição estatisticamente significativa em infartos do miocárdio e acidentes vasculares cerebrais em consequência da diminuição do nível plasmático de colesterol. O estudo fez uso de uma resina ligadora de ácido biliar, a colestiramina, para controlar o colesterol. Os resultados estimularam a busca por intervenções terapêuticas mais efetivas. Alguma controvérsia persistiu até o desenvolvimento das estatinas entre o final da década de 1980 e a década de 1990.

O Dr. Akira Endo, trabalhando na companhia Sankyo, em Tóquio, descobriu a primeira estatina e relatou o trabalho, em 1976. Endo estava estudando o metabolismo do colesterol por algum tempo, e especulou, em 1971, se os fungos estudados na época para a descoberta de novos antibióticos poderiam produzir também um inibidor da síntese do colesterol. Ao longo de um período de vários anos, ele estudou mais de 6 mil culturas de fungos até que um resultado positivo foi encontrado. O composto encontrado foi chamado de compactina (Figura Q-1). O com-

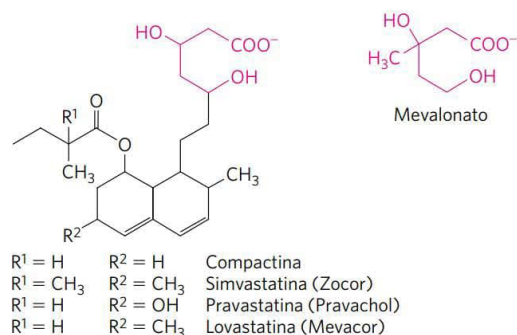


FIGURA Q-1 As estatinas como inibidores da HMG-CoA-redutase. Uma comparação das estruturas do mevalonato e de quatro compostos farmacêuticos (estatinas) que inibem a HMG-CoA-redutase.

(Continua)

QUADRO 21-3



MEDICINA

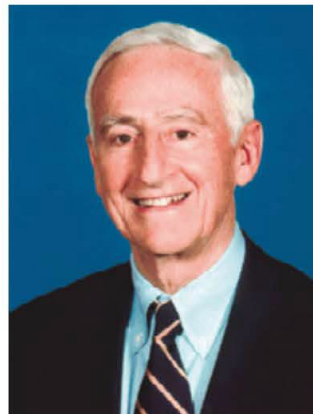
A hipótese lipídica e o desenvolvimento das estatinas (Continuação)



Akira Endo
[Fonte: cortesia de Akira Endo, Ph.D.]



Alfred Alberts
[Fonte: Merck Archives, Merck & Co., Inc. 2016]



P. Roy Vagelos
[Fonte: cortesia de P. Roy Vagelos.]

posto afinal provou ser efetivo na redução dos níveis de colesterol em cães e em macacos, e o trabalho chamou a atenção de Michael Brown e Joseph Goldstein, da escola de medicina da Universidade do Texas-Southwestern. Brown e Goldstein começaram a trabalhar com Endo e confirmaram seus resultados. Alguns resultados dramáticos dos primeiros testes clínicos limitados convenceram diversas indústrias farmacêuticas a unirem-se à busca por estatinas. Uma equipe da Merck, liderada por Alfred Alberts e P. Roy Vagelos, iniciou uma triagem de culturas de fungos e encontrou um resultado positivo após a triagem de apenas 18 culturas. A nova estatina foi chamada de lovastatina (Figura Q-1). Em 1980, um rumor de que a compactina, em altas doses, era carcinogênica em cães quase marginalizou a corrida para desenvolver as estatinas, mas os benefícios aos pacientes com hipercolesterolemia familiar já eram evidentes. Depois de muitas consultas a especialistas ao redor do mundo e ao setor de controle de medicamentos e alimentos nos Estados Unidos (Food and Drug Administration), a Merck prosseguiu cuidadosamente na produção da lovastatina. Testes intensos ao longo das duas décadas seguintes não revelaram efeitos carcinogênicos da lovastatina ou das novas gerações de estatinas que surgiram desde então.

As estatinas inibem a HMG-CoA-redutase, em parte por mimetizarem a estrutura do mevalonato (Figura Q-1), e, assim, inibem a síntese do colesterol. O tratamento com lovastatina diminui o colesterol sérico em até 30% em pessoas com hipercolesterolemia resultante de

uma cópia defeituosa do gene para o receptor de LDL. Quando combinado com uma resina que pode ser ingerida e que liga ácidos biliares e previne sua absorção pelo intestino, o fármaco é ainda mais efetivo.

As estatinas são, atualmente, os fármacos mais amplamente utilizados para a redução do nível do colesterol sérico. Os efeitos colaterais são sempre uma preocupação quando se utilizam fármacos, porém, no caso das estatinas, muitos dos efeitos colaterais são positivos. Esses fármacos podem melhorar o fluxo sanguíneo, aumentar a estabilidade das placas ateroscleróticas (de modo que elas não rompam, obstruindo o fluxo sanguíneo), reduzir a agregação plaquetária e inibir a inflamação vascular. Em pacientes usando estatinas pela primeira vez, alguns desses efeitos ocorrem antes de se observar uma redução nos níveis de colesterol e podem estar relacionados a uma inibição secundária da síntese de isoprenoides. No entanto, nem todos os efeitos das estatinas são positivos. Em alguns pacientes, geralmente entre aqueles ingerindo estatinas em combinação com outros fármacos redutores do colesterol, ocorre dor ou fraqueza muscular que podem se tornar graves ou até mesmo debilitantes. Uma lista razoavelmente longa de outros efeitos colaterais tem sido documentada em pacientes, a maioria sendo rara. Para a maior parte dos pacientes, entretanto, o decréscimo mediado pelas estatinas nos riscos associados com as doenças coronarianas pode ser significativo. Como todos os medicamentos, as estatinas devem ser utilizadas apenas sob recomendação médica.

pobre em colesterol são rapidamente removidas do sangue e destruídas. Tanto a deficiência de HDL familiar como a doença de Tangier são muito raras (em todo o mundo, menos de 100 famílias com a doença de Tangier são conhecidas), mas a existência dessas doenças estabelece uma função para as proteínas ABCA1 e ABCG1 na regulação dos níveis plasmáticos de HDL. ■

Os hormônios esteroides são formados por clivagem da cadeia lateral e oxidação do colesterol

Os seres humanos produzem todos os seus hormônios esteroides a partir do colesterol (Figura 21-48). Duas classes de hormônios esteroides são sintetizadas no córtex da glândula suprarrenal: os **mineralocorticoides**, que controlam

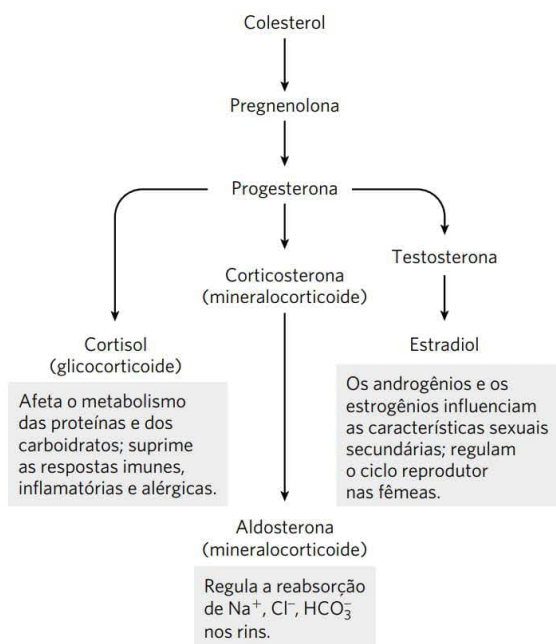
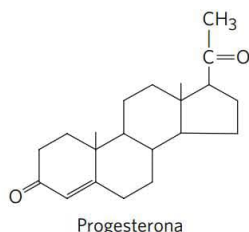


FIGURA 21-48 Alguns hormônios esteroides derivados do colesterol. As estruturas de alguns desses compostos são mostradas na Figura 10-18.

a reabsorção de íons inorgânicos (Na^+ , Cl^- e HCO_3^-) pelos rins, e os **glicocorticoides**, que auxiliam na regulação da gliconeogênese e reduzem a resposta inflamatória. Os hormônios sexuais são produzidos nas gônadas masculinas e femininas e na placenta. Entre eles, estão a **progesterona**, que regula o ciclo reprodutor feminino, e os **androgênios** (como a testosterona) e os **estrogênios** (como o estradiol), que influenciam no desenvolvimento das características sexuais secundárias em machos e em fêmeas, respectivamente. Os hormônios esteroides são efetivos em concentrações muito baixas, sendo, assim, sintetizados em quantidades relativamente pequenas. Em comparação com os sais biliares, sua produção consome relativamente pouco colesterol.



A síntese dos hormônios esteroides requer a remoção de alguns ou de todos os carbonos na cadeia lateral do C-17 do anel D do colesterol. A remoção da cadeia lateral ocorre na mitocôndria dos tecidos esteroidogênicos. A remoção envolve a hidroxilação de dois carbonos na cadeia lateral (C-20 e C-22), seguindo-se a clivagem da ligação entre eles (**Figura 21-49**). A formação dos diversos hormônios também envolve a introdução de átomos de oxigênio. Todas as reações de hidroxilação e oxigenação na biossíntese dos esteroides são catalisadas por oxigenases de função mista (ver Quadro 21-1) que utilizam NADPH, O_2 e citocromo P-450 mitocondrial.

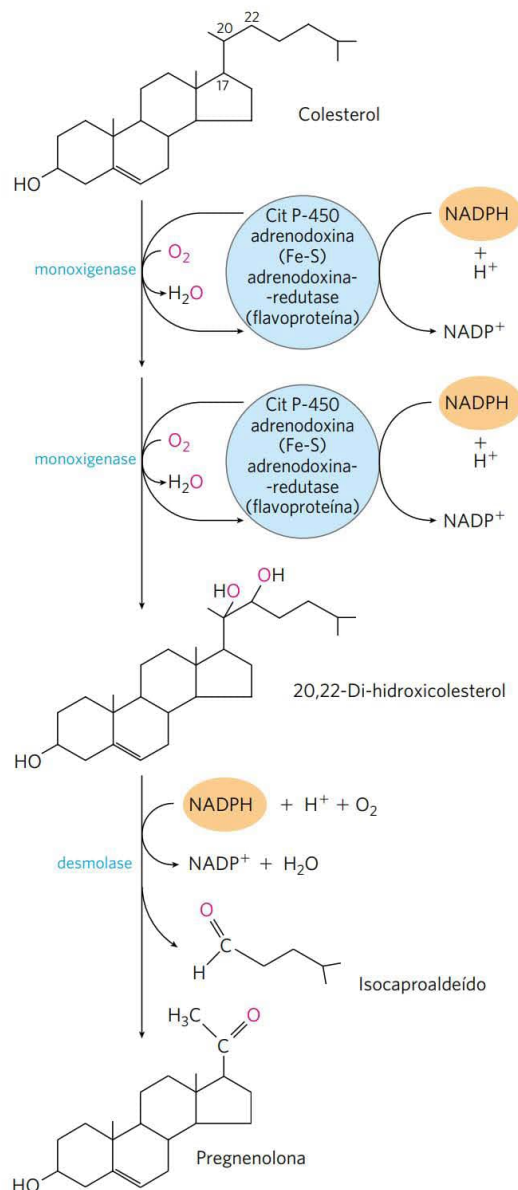


FIGURA 21-49 Clivagem da cadeia lateral na síntese de hormônios esteroides. O citocromo P-450 atua como transportador de elétrons neste sistema de monoxigenase que oxida átomos de carbono adjacentes. O processo também requer as proteínas transportadoras de elétrons adrenodoxina e adrenodoxina-redutase. Esse sistema de clivagem de cadeias laterais é encontrado na mitocôndria das células do córtex da glândula suprarrenal, ativo na produção de hormônios esteroides. A pregnenolona é o precursor de todos os outros hormônios esteroides (ver Figura 21-48).

Os intermediários na biossíntese de colesterol têm muitos destinos alternativos

Além de sua função como intermediário na biossíntese de colesterol, o isopentenil-pirofosfato é o precursor ativado de uma ampla gama de biomoléculas com funções biológicas distintas (**Figura 21-50**). Entre elas incluem-se as vitaminas A, E e K; pigmentos vegetais, como o caroteno e a cadeia fitol da clorofila; borracha natural; muitos óleos essenciais (como os princípios aromáticos dos óleos de li-

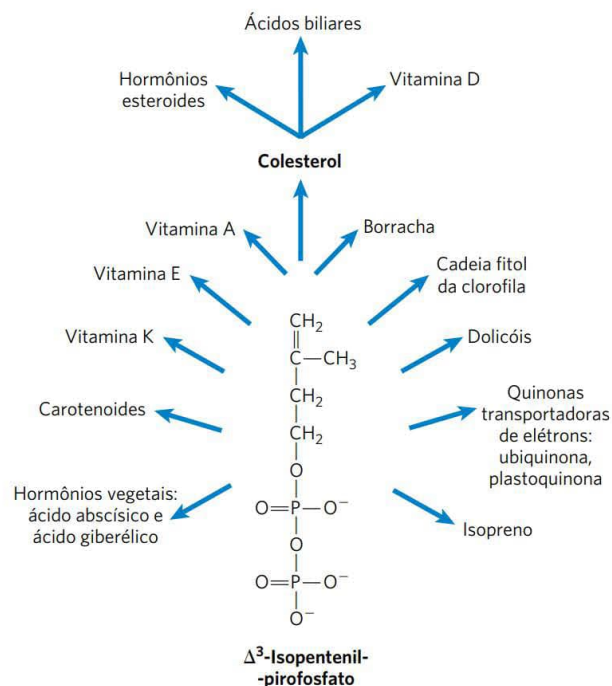


FIGURA 21-50 Visão geral da biossíntese dos isoprenoides. As estruturas da maioria dos produtos finais aqui mostrados são fornecidas no Capítulo 10.

mao, eucalipto e almíscar); hormônio juvenil de insetos, que controla a metamorfose; dolicois, que atuam como transportadores solúveis de lipídeos na síntese de polissacarídeos complexos; e ubiquinona e plastoquinona, transportadores de elétrons na mitocôndria e nos cloroplastos. De modo coletivo, essas moléculas são chamadas de isoprenoides. Mais de 20 mil moléculas isoprenoides distintas foram descobertas na natureza, e centenas de novas moléculas desse tipo são descritas a cada ano.

A prenilação (ligação covalente de um isoprenoide; ver Figura 27-36) é um mecanismo comum pelo qual proteínas são ancoradas à superfície interna de membranas celulares em mamíferos (ver Figura 11-13). Em algumas dessas proteínas, o lipídeo acoplado é o grupo farnesila de 15 carbonos; outras têm o grupo geranyl-geranila de 20 carbonos. Enzimas distintas atuam na ligação dos dois tipos de lipídeos. É possível que as reações de prenilação direcionem as proteínas para membranas distintas, dependendo de qual lipídeo está acoplado. A prenilação de proteínas é outra função importante dos derivados do isopreno da via do colesterol.

RESUMO 21.4 Colesterol, esteroides e isoprenoides: biossíntese, regulação e transporte

- O colesterol é formado a partir de acetil-CoA em uma série complexa de reações, das quais participam os intermediários β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA, mevalonato e dois isoprenos ativados, dimetilalil-pirofosfato e isopentenil-pirofosfato. A condensação de unidades de isopreno produz o composto acíclico esqualeno, que é ciclizado, gerando o sistema de anéis do núcleo esteroidal e a cadeia lateral.

- O colesterol e os ésteres de colesterol são transportados no sangue como lipoproteínas plasmáticas. A VLDL transporta o colesterol, os ésteres de colesterol e os triacilgliceróis do fígado para os demais tecidos, onde os triacilgliceróis são degradados pela lipase lipoproteica, convertendo VLDL em LDL. A LDL, rica em colesterol e seus ésteres, é captada por endocitose mediada por receptor, em que a apolipoproteína B-100 da LDL é reconhecida pelos receptores na membrana plasmática.
- A síntese e o transporte de colesterol estão sob regulação complexa por hormônios, pelo conteúdo de colesterol celular e pelo nível energético (concentração de AMP). A HMG-CoA-redutase é regulada alostericamente e por modificação covalente. Além disso, as velocidades de síntese e de degradação dessa enzima são controladas por um complexo de três proteínas: Insig, SCAP e SREBP, que detectam os níveis de colesterol e provocam o aumento da síntese ou da degradação da HMG-CoA-redutase. O número de receptores de LDL por célula também é regulado pelo conteúdo de colesterol.
- Condições alimentares ou defeitos genéticos no metabolismo do colesterol podem levar à aterosclerose e a doenças cardíacas. No transporte reverso do colesterol, HDL remove colesterol dos tecidos periféricos, transportando-o para o fígado. Por reduzir o conteúdo de colesterol das células espumosas, a HDL protege contra aterosclerose.
- Os hormônios esteroides (glicocorticoides, mineralocorticoides e hormônios sexuais) são produzidos a partir do colesterol por alteração da cadeia lateral e introdução de átomos de oxigênio no sistema de anéis dos esteroides. Além do colesterol, uma ampla variedade de compostos isoprenoides é derivada do mevalonato por meio de condensações do isopentenil-pirofosfato e do dimetilalil-pirofosfato.
- A prenilação de algumas proteínas as direciona para associações com membranas celulares e é essencial para suas atividades biológicas.

Termos-chave

Termos em negrito estão definidos no glossário.

malonil-CoA	811	prostaglandina	
acetil-CoA-carboxilase	811	H ₂ -sintase	824
ácido graxo-sintase	812	tromboxano-sintase	825
proteína transportadora de grupos acila (ACP)	814	tromboxano	825
acil-CoA-dessaturase	821	leucotrieno	825
oxidasas de função mista	821	mediadores especializados pró-resolução (SPM)	826
estearoil-ACP-dessaturase (EAD)	821	lipoxina	826
citocromo P-450	822	glicerol-3-fosfato-desidrogenase	826
oxigenases de função mista	822	ciclo do triacilglicerol	828
ácidos graxos essenciais	824	gliceroneogênese	829
prostaglandina	824	tiazolidinedionas	829
ciclooxigenase (COX)	824	fosfatidilserina	831
		fosfatidilglicerol	831
		fosfatidiletanolamina	833

cardiolipina 833	receptores de LDL 845
fosfatidilcolina 833	endocitose mediada por receptor 846
plasmalogênio 834	lipoproteína de densidade alta (HDL) 847
fator ativador plaquetário 834	transporte reverso do colesterol 847
cerebrosídeo 835	circulação êntero-hepática 847
esfingomielina 835	proteínas de ligação aos elementos reguladores de esterol (SREBP) 848
gangliosídeo 835	proteína ativadora da clivagem da SREBP (SCAP) 848
isopreno 837	proteína induzida por insulina (Insig) 848
mevalonato 838	receptor hepático X (RXR) 849
β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA (HMG-CoA) 838	receptor X de retinoides (RXR) 849
HMG-CoA-sintase 838	receptor farnesoide X (FXR) 849
HMG-CoA-redutase 838	aterosclerose 849
esqualeno 839	célula espumosa 850
ácidos biliares 842	estatina 850
ésteres de colesterol 842	
apolipoproteínas 842	
quilomícron 843	
via exógena 844	
lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) 844	
lipoproteína de densidade baixa (LDL) 845	
via endógena 845	

Teste seu conhecimento

1. Via do carbono na síntese dos ácidos graxos Utilizando seu conhecimento sobre a biossíntese de ácidos graxos, dê uma explicação para as seguintes observações experimentais:

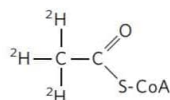
- A adição de acetil-CoA, uniformemente marcada com ^{14}C , a uma fração solúvel de fígado gera palmitato uniformemente marcado com o ^{14}C .
- Entretanto, a adição de *traços* de acetil-CoA uniformemente marcada com ^{14}C na presença de um excesso de malonil-CoA não marcada a uma fração solúvel de fígado gera palmitato marcado com ^{14}C apenas em C-15 e C-16.

2. Síntese de ácidos graxos a partir da glicose Depois de uma pessoa ter ingerido grande quantidade de sacarose, a glicose e a frutose que excedem as necessidades calóricas são transformadas em ácidos graxos para a síntese de triacilgliceróis. A síntese de ácidos graxos consome acetil-CoA, ATP e NADPH. Como essas substâncias são produzidas a partir da glicose?

3. Equação global da síntese de ácidos graxos Escreva a equação global líquida para a biossíntese de palmitato em fígado de rato, a partir de acetil-CoA mitocondrial e NADPH, ATP e CO_2 citosólicos.

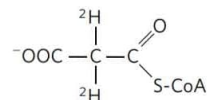
4. Via do hidrogênio na síntese de ácidos graxos Considere uma preparação que contenha todas as enzimas e todos os cofatores necessários para a biossíntese de ácidos graxos a partir de acetil-CoA e malonil-CoA.

- Se $[2\text{-}^3\text{H}]\text{acetil-CoA}$ (marcada com deutério, o isótopo pesado do hidrogênio)



e um excesso de malonil-CoA não marcada são adicionadas como substratos, quantos átomos de deutério são incorporados em cada molécula de palmitato? Quais são suas localizações? Explique.

- Se acetil-CoA não marcada e $[2\text{-}^3\text{H}]\text{malonil-CoA}$



são adicionadas como substratos, quantos átomos de deutério são incorporados em cada molécula de palmitato? Quais são suas localizações? Explique.

5. Energética da β -cetoacil-ACP-sintase Na reação de condensação catalisada pela β -cetoacil-ACP-sintase (ver Figura 21-6), uma unidade de quatro carbonos é sintetizada pela combinação de uma unidade de dois carbonos com uma unidade de três carbonos, com liberação de CO_2 . Qual a vantagem termodinâmica desse processo sobre aquele que simplesmente combina duas unidades de dois carbonos?

6. Modulação da acetil-CoA-carboxilase A acetil-CoA-carboxilase é o principal ponto de regulação na biossíntese dos ácidos graxos. Algumas das propriedades da enzima são descritas a seguir.

- A adição de citrato ou isocitrato eleva a $V_{\text{máx}}$ da enzima em até 10 vezes.
- A enzima existe em duas formas interconvertíveis que diferem muito em suas atividades:

Protômeros (inativos) \rightleftharpoons polímeros filamentosos (ativos)

Citrato e isocitrato ligam-se, preferencialmente, à forma filamentosa, e palmitoil-CoA liga-se, preferencialmente, ao protômero.

Explique como essas propriedades são consistentes com o papel regulador da acetil-CoA-carboxilase na biossíntese de ácidos graxos.

7. Lançadeira de grupos acetila através da membrana interna da mitocôndria O grupo acetila da acetil-CoA, produzido pela descarboxilação oxidativa do piruvato dentro da mitocôndria, é transferido para o citosol pela lançadeira de grupos acetila esquematizada na Figura 21-10.

- Escreva a equação global para a transferência de um grupo acetila da mitocôndria para o citosol.
- Qual é o custo desse processo em ATP por grupo acetila?
- No Capítulo 17, encontramos um transportador de grupo acila na transferência de acil-CoA-graxo do citosol para a mitocôndria na preparação para a β -oxidação (ver Figura 17-6). Um resultado desse transporte é a separação dos conjuntos mitocondrial e citosólico de CoA. A lançadeira de grupos acetila também realiza essa função? Explique.

8. Necessidade de oxigênio para as dessaturases A biossíntese de palmitoleato (ver Figura 21-12), um ácido graxo insaturado comum, com uma ligação dupla *cis* na posição Δ^9 , utiliza palmitato como precursor. A síntese de palmitoleato pode ser realizada em condições estritamente anaeróbicas? Explique.

9. Custo energético da síntese de triacilgliceróis Utilize a equação global líquida para a biossíntese de tripalmitoilglicerol (tripalmitina) a partir de glicerol e palmitato para mostrar quantos ATP são necessários por molécula de tripalmitina formada.

10. Renovação dos triacilgliceróis no tecido adiposo Quando [^{14}C]glicose é adicionada a uma dieta equilibrada fornecida a ratos adultos, não há aumento na quantidade total de triacilgliceróis estocados, mas estes se tornam marcados com ^{14}C . Explique.

11. Custo energético da síntese de fosfatidilcolina Escreva a sequência de etapas e a reação global para a biossíntese de fosfatidilcolina pela via de recuperação a partir de oleato, palmitato, di-hidroxiacetona-fosfato e colina. Iniciando com esses precursores, qual é o custo (em número de ATP) da síntese de fosfatidilcolina pela via de recuperação?

12. Via de recuperação para a síntese de fosfatidilcolina Um rato jovem mantido em dieta deficiente em metionina não se desenvolve adequadamente a não ser que seja incluída colina na dieta. Explique.

13. Síntese de isopentenil-pirofosfato Se [$2\text{-}^{14}\text{C}$]acetil-CoA é adicionada a um homogeneizado de fígado de rato que está sintetizando colesterol, onde aparecerá a marcação com ^{14}C no Δ^3 -isopentenil-pirofosfato, a forma ativada de uma unidade isopreno?

14. Doadores ativados na síntese de lipídeos Na biossíntese de lipídeos complexos, os componentes são reunidos pela transferência do grupo apropriado a partir de um doador ativado. Por exemplo, o doador ativado de grupos acetila é a acetil-CoA. Para cada um dos grupos seguintes, forneça a forma do doador ativado: (a) fosfato; (b) D-glicosila; (c) fosfoetanolamina; (d) D-galactosila; (e) acila graxa; (f) metila; (g) o grupo de dois carbonos na biossíntese de ácidos graxos; (h) Δ^3 -isopentenila.

15. Importância das gorduras na dieta Quando ratos jovens são alimentados com uma dieta totalmente livre de gordura, eles crescem muito pouco, desenvolvem uma dermatite escamosa, perdem pelo e morrem em pouco tempo – sintomas que podem ser prevenidos se linoleato ou material vegetal é incluído na dieta. O que faz do linoleato um ácido graxo essencial? Por que o material vegetal pode ser utilizado?

16. Regulação da biossíntese de colesterol O colesterol em seres humanos pode ser obtido a partir da dieta ou sintetizado de novo. Um ser humano adulto com dieta pobre em colesterol sintetiza, em geral, 600 mg de colesterol por dia no fígado. Se a quantidade de colesterol na dieta é elevada, a síntese *de novo* do colesterol é significativamente reduzida. Como ocorre essa regulação?



17. Redução dos níveis de colesterol sérico com estatinas Pacientes tratados com um fármaco do tipo estatina geralmente exibem uma redução dramática do colesterol sérico. Entretanto, a quantidade da enzima HMG-CoA-redutase presente nas células pode aumentar substancialmente. Sugira uma explicação para esse efeito.

18. Funções dos tioésteres na biossíntese de colesterol Esquematize um mecanismo para cada uma das três reações mostradas na Figura 21-34, detalhando a via para a síntese de mevalonato a partir de acetil-CoA.

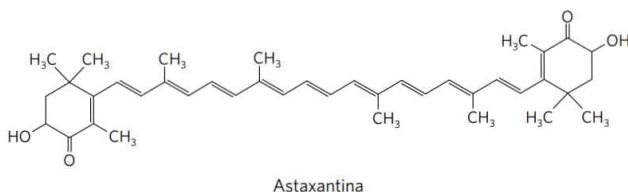


19. Potenciais efeitos colaterais do tratamento com estatinas Embora testes clínicos ainda não tenham sido realizados para documentar os benefícios e os efeitos colaterais, alguns médicos sugerem que pacientes em tratamento com estatinas também utilizem suplemento de coenzima Q. Sugira uma razão para essa recomendação.

Problema de análise de dados

20. Engenharia genética em *E. coli* para a produção de grandes quantidades de um isoprenoide Uma grande variedade de isoprenoides ocorre naturalmente, alguns deles sendo produzidos industrialmente, tendo importância médica e/ou comercial. Os métodos de produção incluem a síntese enzimática *in vitro*, que é um processo caro e de baixo rendimento. Em 1999, Wang, Oh e Liao publicaram seus experimentos, em que modificavam geneticamente a bactéria de fácil crescimento *E. coli* para produzir grandes quantidades de astaxantina, um isoprenoide de importância comercial.

A astaxantina é um pigmento carotenoide laranja-avermelhado (um antioxidante) produzido por uma alga marinha. Animais marinhos, como camarão, lagosta e alguns peixes que se alimentam de algas, têm suas colorações em cor de laranja devido à ingestão de astaxantina. A astaxantina é composta por oito unidades isoprenoides; sua fórmula molecular é $\text{C}_{40}\text{H}_{52}\text{O}_4$.



(a) Circle as oito unidades isoprenoides na molécula de astaxantina. Dica: use os grupos metila projetados como guia.

A astaxantina é sintetizada pela via mostrada na próxima página, iniciando com Δ^3 -isopentenil-pirofosfato (IPP). As etapas 1 e 2 estão mostradas na Figura 21-36, e a reação catalisada pela IPP-isomerase é mostrada na Figura 21-35.

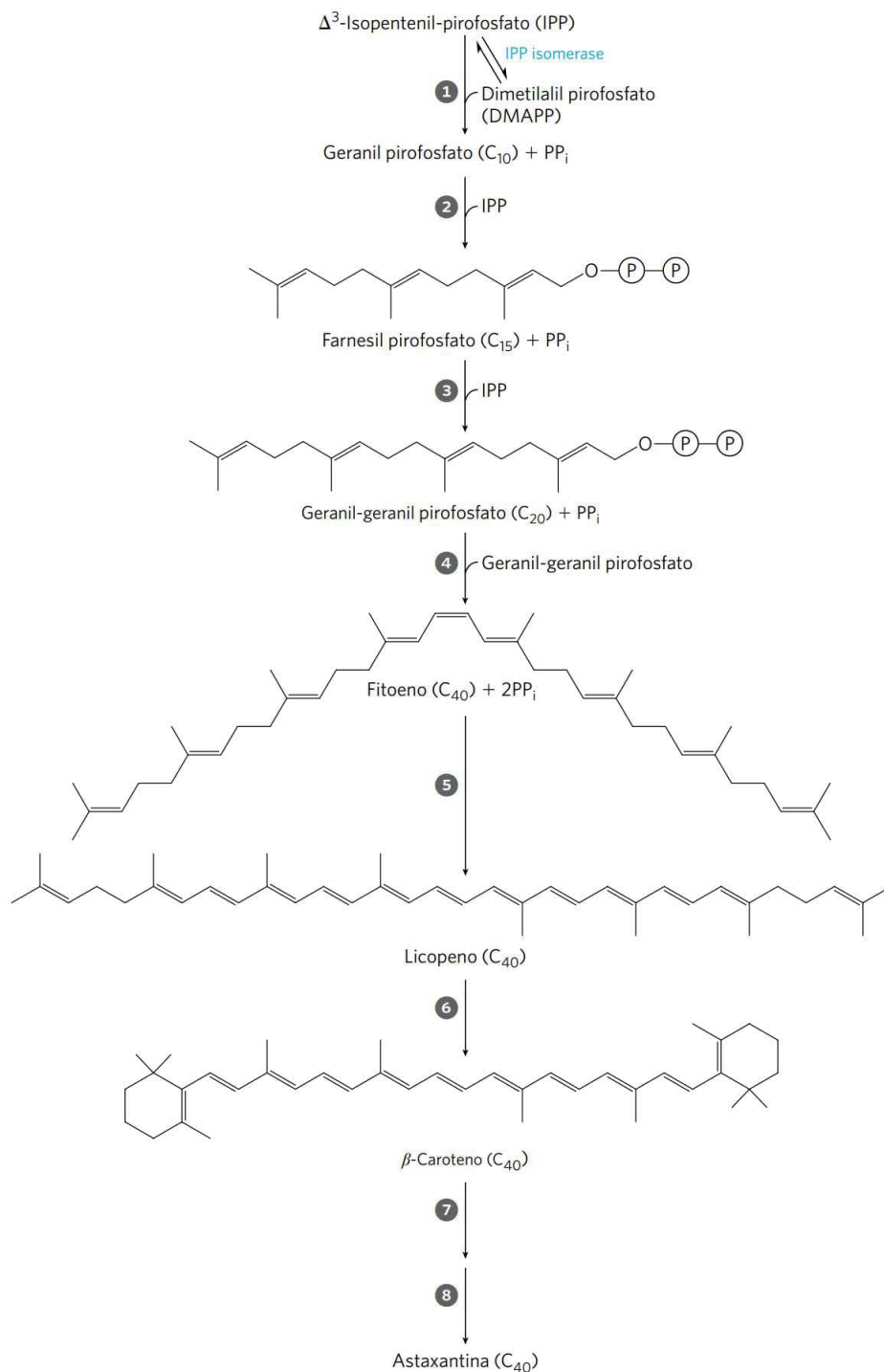
(b) Na etapa 4 da via, duas moléculas de geranyl-geranyl-pirofosfato são ligadas, formando fitoeno. Esta é uma ligação cabeça com cabeça ou cabeça com cauda? (Ver detalhes na Figura 21-36.)

(c) Descreva brevemente a reação química na etapa 5.

(d) A síntese de colesterol (Figura 21-37) inclui uma ciclização (fechamento de anel) que envolve uma oxidação líquida por O_2 . A ciclização na etapa 6 da via sintética da astaxantina requer a oxidação líquida do substrato (licopeno)? Explique o raciocínio utilizado.

A *E. coli* não produz grandes quantidades de muitos isoprenoides e não sintetiza astaxantina. Sabe-se que ela sintetiza pequenas quantidades de IPP, DMAPP, geranyl-pirofosfato, farnesil-pirofosfato e geranyl-geranyl-pirofosfato. Wang e colaboradores clonaram vários dos genes de *E. coli* que codificam as enzimas necessárias para a síntese de astaxantina em plasmídeos que permitiram sua superexpressão. Esses genes incluem o *idi*, que codifica a IPP-isomerase, e o *ispA*, que codifica uma prenil-transferase que catalisa as etapas 1 e 2.

Para modificar geneticamente uma *E. coli*, tornando-a capaz de realizar a via completa da astaxantina, Wang e colaboradores clonaram vários genes de outras bactérias em plasmídeos que permitiriam sua superexpressão em *E. coli*. Esses genes incluíam *crtE* da *Erwinia uredovora*, que codifica uma enzima que catalisa a etapa 3; e *crtB*, *crtI*, *crtY*, *crtZ* e *crtW* da *Agrobacterium aurantiacum*, que codificam as enzimas das etapas 4, 5, 6, 7 e 8, respectivamente.



Os investigadores também clonaram o gene *gps* da *Archaeoglobus fulgidus*, superexpressaram esse gene em *E. coli* e extraíram o produto gênico. Quando esse extrato foi incubado com [^{14}C]IPP e DMAPP ou com geranil-pirofosfato, ou farnesil-pirofosfato, apenas foi produzido o geranil-geranil-pirofosfato marcado com ^{14}C , em todos os casos.

(e) Com base nesses dados, qual(is) etapa(s) da via é(são) catalisada(s) pela enzima codificada pelo *gps*? Explique o raciocínio utilizado.

Wang e colaboradores, então, construíram diversas linhagens de *E. coli* que superexpressavam diferentes genes e mediram a cor laranja das colônias (colônias de *E. coli* do tipo selvagem são esbranquiçadas) e a quantidade de astaxantina.

xantina produzida (medida por sua cor laranja). Seus resultados são mostrados a seguir (ND indica não determinado).

Linhagem	Gene(s) superexpresso	Cor laranja	Rendimento em astaxantina (μg/g peso seco)
1	<i>crtBIZYW</i>	–	ND
2	<i>crtBIZYW, ispA</i>	–	ND
3	<i>crtBIZYW, idi</i>	–	ND
4	<i>crtBIZYW, idi, ispA</i>	–	ND
5	<i>crtBIZYW, crtE</i>	+	32,8
6	<i>crtBIZYW, crtE, ispA</i>	+	35,3
7	<i>crtBIZYW, crtE, idi</i>	++	234,1
8	<i>crtBIZYW, crtE, idi, ispA</i>	+++	390,3
9	<i>crtBIZYW, gps</i>	+	35,6
10	<i>crtBIZYW, gps, idi</i>	111	1.418,8

- (f) Comparando os resultados para as linhagens de 1 a 4 com aqueles para as linhagens de 5 a 8, o que você pode concluir sobre o nível de expressão de uma enzima capaz de catalisar a etapa 3 da via sintética da astaxantina em *E. coli* do tipo selvagem? Explique o raciocínio utilizado.
- (g) Com base nos dados, qual enzima é limitante nessa via, a IPP-isomerase ou a enzima codificada pelo *idi*? Explique o raciocínio utilizado.
- (h) Você esperaria que uma linhagem superexpressando *crtBIZYW, gps* e *crtE* produza baixos (+), médios (++) ou altos (+++) níveis de astaxantina, medidos por sua cor laranja? Explique o raciocínio utilizado.

Referência

Wang, C.-W., M.-K. Oh e J.C. Liao. 1999. Engineered isoprenoid pathway enhances astaxanthin production in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 62:235–241.

Biossíntese de aminoácidos, nucleotídeos e moléculas relacionadas

22.1 Visão geral do metabolismo do nitrogênio 859

22.2 Biossíntese de aminoácidos 869

22.3 Moléculas derivadas de aminoácidos 880

22.4 Biossíntese e degradação de nucleotídeos 888

O nitrogênio perde apenas para o carbono, o hidrogênio e o oxigênio em sua contribuição para a massa dos sistemas vivos. A maior parte desse nitrogênio está ligada à estrutura de aminoácidos e nucleotídeos. Neste capítulo, serão abordados todos os aspectos do metabolismo desses compostos nitrogenados, exceto o catabolismo dos aminoácidos, que foi discutido no Capítulo 18.

A discussão conjunta das vias biossintéticas dos aminoácidos e dos nucleotídeos é uma abordagem válida, não apenas porque as duas classes de moléculas contêm nitrogênio (oriundo de fontes biológicas em comum), mas porque os dois conjuntos de vias se encontram intensamente entrelaçados, com diversos intermediários-chave em comum. Certos aminoácidos ou partes de aminoácidos são incorporados nas estruturas de purinas e pirimidinas e, em um caso, parte de um anel púrico é incorporado em um aminoácido (a histidina). Os dois conjuntos de vias também compartilham muito da química, em especial uma preponderância de reações envolvendo a transferência de nitrogênio ou de grupos de um carbono.

As vias aqui descritas podem ser intimidantes para um estudante iniciando seus estudos de bioquímica. Sua complexidade surge não tanto da própria química, que em muitos casos é bem conhecida, mas do grande número de etapas e da variedade de intermediários. Essas vias serão mais bem compreendidas pelo enfoque nos princípios metabólicos já discutidos, os intermediários-chave e precursores e as classes comuns de reações. Mesmo um olhar superficial na química pode ser recompensador, pois nessas vias ocorrem algumas das transformações químicas mais incomuns nos sistemas biológicos; por exemplo, são encontrados exemplos notáveis do raro uso biológico dos metais molibdênio, selênio e vanádio. Esse esforço também oferece vantagens práticas, principalmente para alunos de medicina humana ou veterinária. Muitas doenças genéticas de seres humanos e animais têm sido atribuídas à ausência de uma ou mais

enzimas do metabolismo de aminoácidos e nucleotídeos, e muitos produtos farmacêuticos de uso comum para combater doenças infecciosas são inibidores de enzimas nessas vias – assim como alguns dos agentes mais importantes na quimioterapia do câncer.

A regulação é crucial na biossíntese de compostos nitrogenados. Já que cada aminoácido e cada nucleotídeo é necessário em quantidades relativamente pequenas, o fluxo metabólico pela maioria dessas vias é muito menor que o fluxo biossintético de carboidratos e gorduras nos tecidos animais. Uma vez que os diferentes aminoácidos e nucleotídeos devem ser produzidos nas proporções adequadas e no momento certo para a síntese de proteínas e ácidos nucleicos, suas vias biossintéticas devem ser reguladas e coordenadas umas às outras com precisão. Além disso, uma vez que aminoácidos e nucleotídeos são moléculas carregadas positiva ou negativamente, seus níveis devem ser regulados para manter um equilíbrio eletroquímico na célula. Como discutido nos capítulos anteriores, as vias metabólicas podem ser controladas por alterações na atividade ou na quantidade de enzimas específicas. As vias abordadas neste capítulo fornecem alguns dos exemplos melhor compreendidos de regulação da atividade enzimática. O controle das *quantidades* de diferentes enzimas em uma célula (i.e., das respectivas síntese e degradação) é um tópico que será estudado no Capítulo 28.

22.1 Visão geral do metabolismo do nitrogênio

As vias biossintéticas que levam à produção de aminoácidos e nucleotídeos compartilham uma característica: a necessidade de nitrogênio. Uma vez que compostos nitrogenados solúveis e biologicamente úteis são escassos nos ambientes naturais, a maior parte dos organismos mantém uma estrita economia na utilização de amônia, aminoácidos e nucleotídeos. De fato, como será visto, aminoácidos, purinas e pirimidinas livres, formados durante a renovação metabólica de proteínas e ácidos nucleicos, frequentemente são utilizados em vias de recuperação, isto é, são reutilizados. Inicialmente, serão examinadas as vias pelas quais o nitrogênio do ambiente é introduzido nos sistemas biológicos.

O ciclo do nitrogênio permite a manutenção de um estoque de nitrogênio biologicamente disponível

A fonte mais importante de nitrogênio é o ar, que apresenta quatro quintos de sua constituição formado por nitrogênio molecular (N_2). Relativamente poucas espécies podem converter o nitrogênio atmosférico em formas úteis para os organismos vivos. Na biosfera, os processos metabólicos de diferentes espécies funcionam de forma interdependente, salvando e reutilizando formas de nitrogênio biologicamente disponíveis em um vasto **ciclo do nitrogênio** (Figura 22-1). O primeiro passo no ciclo é a **fixação** (redução) do nitrogênio atmosférico por bactérias fixadoras de nitrogênio, produzindo amônia (NH_3 ou NH_4^+). Embora a amônia possa ser utilizada pela maior parte dos organismos vivos, as bactérias do solo, que obtêm sua energia pela oxidação da amônia em nitrito (NO_2^-) e, por fim, em nitrato (NO_3^-), são tão abundantes e ativas que praticamente toda a amônia que chega ao solo é oxidada a nitrato. Esse processo é denominado **nitrificação**. Plantas e muitas bactérias podem captar e reduzir facilmente nitrato e nitrito a amônia, pela ação de nitrato e nitrito-redutases. A amônia assim produzida é incorporada nos aminoácidos pelas plantas. Os animais, então, usam plantas como fonte de aminoácidos para sintetizar suas proteínas. Quando os organismos morrem, a degradação microbiana de suas proteínas retorna a amônia ao solo, onde bactérias nitrificantes novamente a convertem em nitrito e nitrato. Um equilíbrio entre o nitrogênio fixado e o nitrogênio atmosférico é mantido por bactérias que reduzem nitrato a N_2 em condições anaeróbicas, um processo denominado **desnitrificação** (Figura 22-1). Essas bactérias do solo usam NO_3^- ou NO_2^- , e não O_2 , como o aceptor final de elétrons em uma série de reações que (como a fosforilação oxidativa) gera um gradiente de prótons transmembrana, o qual é usado para a síntese de ATP.

O ciclo do nitrogênio pode sofrer uma espécie de “curto-circuito”, promovido por um grupo de bactérias, as quais realizam a oxidação anaeróbica da amônia, ou **anamox** (Figura 22-1), processo que converte amônia e nitrito em N_2 . Entre 50 e 70% da conversão da NH_3 em N_2 na biosfera pode ocorrer por meio dessa via, que só foi detectada na década de 1980. Os organismos anaeróbios obrigatórios que promovem a anamox são fascinantes por suas características e fornecem algumas soluções úteis para os problemas de tratamento de resíduos (Quadro 22-1).

Agora, serão examinados os processos geradores da amônia que é incorporada em microrganismos, nos vegetais e nos animais que deles se alimentam.

Mais de 90% do NH_4^+ gerado por plantas vasculares, algas e microrganismos provém da assimilação do nitrato, em um processo que compreende duas etapas. Inicialmente, o NO_3^- é reduzido a NO_2^- pela **nitrato-redutase**, e, então, o NO_2^- é reduzido a NH_4^+ em uma transferência de seis elétrons catalisada pela **nitrito-redutase** (Figura 22-2). Ambas as reações envolvem cadeias de carreadores de elétrons e cofatores ainda não considerados neste estudo. A nitrato-redutase é uma proteína grande e solúvel (M_r 220.000). Dentro da enzima, um par de elétrons, doado pelo NADH, flui pelos grupos —SH da cisteína, FAD e de um citocromo

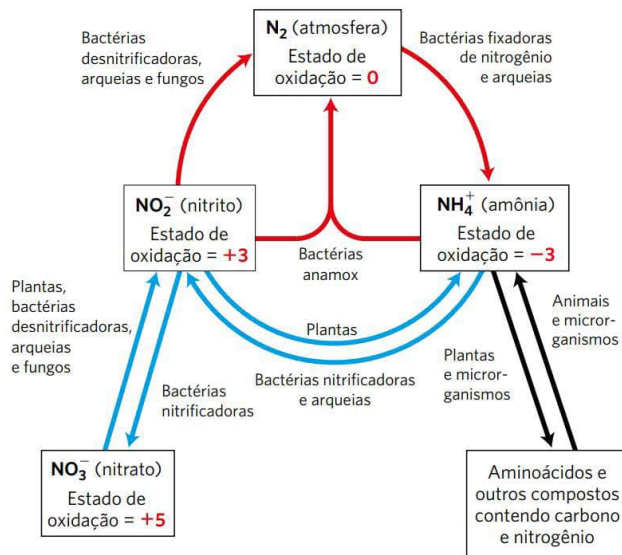


FIGURA 22-1 O ciclo do nitrogênio. A quantidade total de nitrogênio fixado anualmente na biosfera excede 10^{11} kg. As reações com setas vermelhas ocorrem inteiramente ou em sua maior parte em ambientes anaeróbicos.

(cit b_{557}), e daí para um novo cofator contendo molibdênio, antes de reduzir o substrato NO_3^- a NO_2^- .

A nitrito-redutase das plantas está localizada nos cloroplastos e recebe elétrons da ferredoxina (é reduzida em reações fotodependentes na fotossíntese; ver Seção 20.2). Seis elétrons, doados um por vez pela ferredoxina, passam por um centro 4Fe-4S na enzima e, então, por uma nova molécula do tipo heme (siro-heme) antes de reduzir o NO_2^- a NH_4^+ (Figura 22-2). Em microrganismos não fotossintéticos, o NADPH fornece os elétrons para essa reação.

A atividade humana apresenta um desafio crescente para o equilíbrio global do nitrogênio e para toda a vida na biosfera apoiada por esse equilíbrio. O nitrogênio fixado usado na agricultura, principalmente em fertilizantes, agora contribui com tanta amônia e outras espécies reativas de nitrogênio para a biosfera quanto a dos processos naturais, e a atividade industrial libera ainda mais nitrogênio reativo na atmosfera. O controle dos efeitos prejudiciais do escoamento agrícola e dos poluentes industriais continuará sendo um componente importante do esforço contínuo para expandir o suprimento de alimentos para uma população humana em crescimento.

A fixação do nitrogênio é realizada por enzimas do complexo da nitrogenase

A disponibilidade de nitrogênio fixado, um nutriente essencial, pode ter limitado o tamanho da biosfera primordial. Como as primeiras células adquiriram uma capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico, a biosfera expandiu-se. Evidências de fixação biológica de nitrogênio foram encontradas em rochas sedimentares com mais de 3 bilhões de anos.

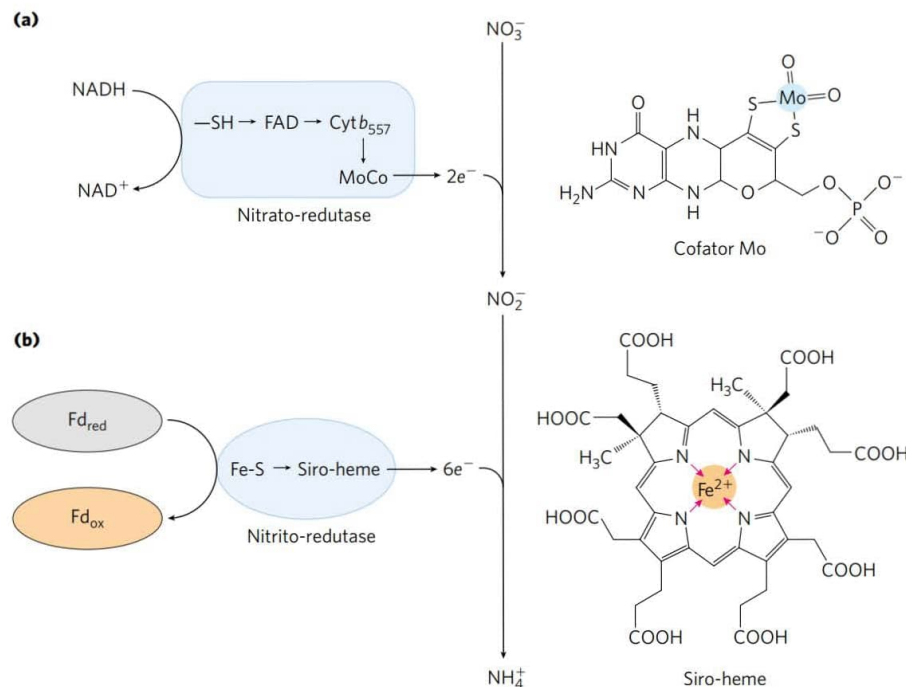


FIGURA 22-2 Assimilação do nitrato pela nitrato-redutase e pela nitrito-redutase. **(a)** As nitrato-redutases de plantas e bactérias catalisam a redução de dois elétrons de NO_3^- para NO_2^- , na qual um novo cofator contendo Mo desempenha um papel central. O NADH é o doador de elétrons. **(b)** A nitrito-redutase converte o produto da nitrato-redutase em NH_4^+ , em um processo de transferência de seis elétrons e oito prótons, em que o centro metálico no siro-heme transporta elétrons e os grupos carboxila do siro-heme podem doar prótons. A fonte inicial de elétrons é a ferredoxina reduzida.

Na biosfera atual, apenas certas bactérias e arqueias podem fixar o N_2 atmosférico. Esses organismos, denominados diazotróficos, incluem as cianobactérias do solo e de águas doces e salgadas, arqueias metanogênicas (anaeróbios estritos que obtêm energia e carbono pela conversão de H_2 e CO_2 em metano), outros tipos de bactérias do solo de vida livre, como espécies de *Azotobacter*, e bactérias fixadoras de nitrogênio que vivem como **simbiontes** em nódulos de raízes de plantas leguminosas. O primeiro produto importante da fixação do nitrogênio é a amônia, que pode ser utilizada por todos os organismos, seja diretamente ou após conversão em outros compostos solúveis, como nitritos, nitratos ou aminoácidos.

A redução do nitrogênio em amônia é uma reação exergônica:



A ligação tripla $\text{N}\equiv\text{N}$, entretanto, é muito estável, com uma energia de ligação de 930 kJ/mol. Assim, a fixação do nitrogênio tem uma energia de ativação extremamente alta e o nitrogênio atmosférico é quase quimicamente inerte em condições normais. A amônia é produzida industrialmente pelo processo de Haber (assim denominado em homenagem a seu inventor, Fritz Haber), que requer temperaturas de 400 a 500°C e pressões de nitrogênio e hidrogênio de dezenas de milhares de quilopascals (diversas centenas de atmosferas) para fornecer a energia de ativação necessária.

A fixação biológica de nitrogênio, no entanto, deve ocorrer em temperaturas biologicamente adequadas e a 0,8 atmosfera de nitrogênio, e a alta barreira da energia de ativação deve ser contornada utilizando outros meios. Isso é

realizado, pelo menos em parte, pela ligação e a hidrólise do ATP. A reação global pode ser escrita



A fixação biológica do nitrogênio é realizada por um complexo altamente conservado de proteínas, denominado **complexo da nitrogenase**, cujos componentes centrais são a **dinitrogenase-redutase** e a **dinitrogenase** (Figura 22-3a). A dinitrogenase-redutase (M_r 60.000) é um dímero de duas subunidades idênticas. Ela contém um único centro *redox* 4Fe-4S (ver Figura 19-5), ligado entre as subunidades, que pode ser oxidado e reduzido por um elétron. Essa enzima também tem dois sítios para ligação de ATP/ADP (um sítio em cada subunidade). A dinitrogenase (M_r 240.000), um tetrâmero $\alpha_2\beta_2$, tem dois cofatores contendo ferro, que transferem elétrons (Figura 22-3b). Um deles, o **grupo P**, contém um par de centros 4Fe-4S que compartilham um átomo de enxofre, constituindo um centro 8Fe-7S. O segundo cofator na dinitrogenase é o **cofator FeMo**, uma estrutura nova, composta por 7 átomos de Fe, 9 átomos de S inorgânico, uma cadeia lateral de Cys e um único átomo de carbono no centro do grupo FeS. Também parte do cofator é um átomo de molibdênio, com ligantes que incluem 3 átomos de S inorgânico, uma cadeia lateral de His e dois átomos de oxigênio de uma molécula de homocitrato, que é parte intrínseca do cofator FeMo. Há também uma forma de nitrogenase que contém vanádio, em vez de molibdênio, e algumas espécies de bactérias podem produzir ambos os tipos de enzimas. A enzima contendo vanádio pode ser o principal sistema de fixação de nitrogênio sob certas condições

QUADRO 22-1 Estilos de vida incomuns de seres obscuros, porém abundantes

Como seres que respiram ar, os seres humanos facilmente deixam de prestar atenção em bactérias e arqueias que proliferam em ambientes anaeróbicos. Embora raramente estejam caracterizados em textos introdutórios de bioquímica, esses organismos constituem boa parte da biomassa deste planeta, e suas contribuições ao equilíbrio de carbono e nitrogênio na biosfera são essenciais para todas as formas de vida.

Como detalhado em capítulos anteriores, a energia utilizada para a manutenção dos sistemas vivos depende da geração de gradientes de prótons através de membranas. Os elétrons obtidos de um substrato reduzido são disponibilizados para carreadores de elétrons nas membranas e passam através de uma série de compostos transportadores de elétrons até um aceptor final de elétrons. Como produto colateral desse processo, prótons são liberados para um dos lados da membrana, gerando um gradiente de prótons transmembrana. O gradiente de prótons é utilizado para sintetizar ATP ou para impulsionar outros processos dependentes de energia. Para todos os eucariotos, o substrato reduzido geralmente é um carboidrato (glicose ou piruvato) ou um ácido graxo, e o aceptor de elétrons é o oxigênio.

Muitas bactérias e arqueias são bem mais versáteis. Em ambientes anaeróbicos, como sedimentos marítimos e de água doce, a variedade de estratégias vitais é extraordinária. Quase qualquer par *redox* disponível pode ser fonte de energia para algum organismo especializado ou para um grupo de organismos. Por exemplo, um grande número de bactérias litotróficas (litotrófico é um quimiotrófico que utiliza fontes inorgânicas para obter energia; ver Figura 1-6) tem uma hidrogenase que utiliza hidrogênio molecular para reduzir o NAD^+ :



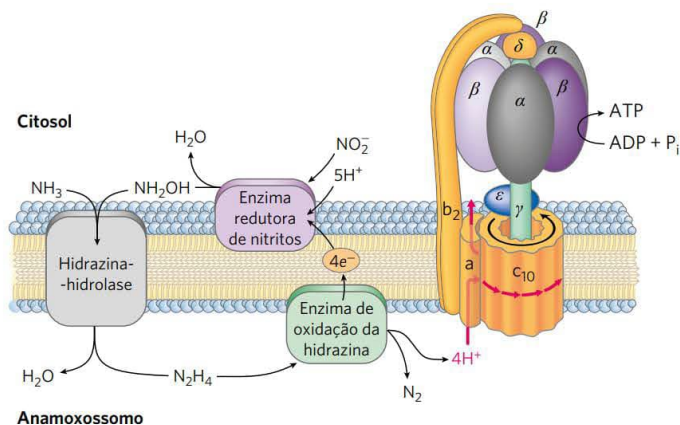
O NADH é uma fonte de elétrons para vários aceptores de elétrons ligados a membranas, gerando o gradiente de prótons necessário para a síntese de ATP. Outros organismos litotróficos oxidam compostos sulfurosos (H_2S ,

enxofre elementar ou tiosulfato) ou íons ferrosos. Um amplo grupo de arqueias, denominado metanogênicos, todos anaeróbios estritos, extrai energia a partir da redução de CO_2 a metano. E essa é apenas uma pequena amostra daquilo que os organismos anaeróbicos fazem para sobreviver. Suas vias metabólicas estão repletas de reações interessantes e de cofatores altamente especializados, desconhecidos em nosso próprio mundo de metabolismo aeróbico obrigatório. O estudo desses organismos pode gerar vantagens práticas, além de fornecer pistas sobre as origens da vida em uma Terra primitiva, em uma atmosfera carente de oxigênio molecular.

O ciclo do nitrogênio depende de um amplo espectro de bactérias especializadas. Há dois grupos de bactérias nitrificantes: aquelas que oxidam amônia a nitritos e aquelas que oxidam os nitritos resultantes a nitratos (ver Figura 22-1). O nitrato perde apenas para o O_2 como um aceptor biológico de elétrons e uma grande quantidade de bactérias e arqueias pode catalisar a desnitrificação de nitratos e nitritos a nitrogênio, que as bactérias fixadoras de nitrogênio convertem em amônia. A amônia é o principal poluente presente em esgotos e em dejetos de animais em fazendas, sendo também um produto derivado do refinamento de óleo e da indústria de fertilizantes. Plantas para o tratamento desses resíduos utilizam comunidades de bactérias nitrificantes e desnitrificantes para converter resíduos contendo amônia em nitrogênio atmosférico. O processo é caro e requer o fornecimento de carbono orgânico e de oxigênio.

Nas décadas de 1960 e 1970, alguns poucos artigos de pesquisa na literatura sugeriram que a amônia poderia ser oxidada anaerobicamente a nitrogênio, utilizando nitrito como aceptor de elétrons; esse processo foi denominado anamox. Os relatos receberam pouca atenção até bactérias que realizam anamox serem descobertas em um sistema de tratamento de dejetos em Delft, na Holanda, em meados da década de 1980. Uma equipe de microbiologistas holandeses liderada por Gijs Kuenen e Mike Jetten iniciou o estudo dessas bactérias, logo identifica-

FIGURA Q-1 As reações anamox. A amônia e a hidroxilamina são convertidas em hidrazina e H_2O pela hidrazina-hidrolase, e a hidrazina é oxidada pela enzima oxidante da hidrazina, gerando N_2 e prótons. Os prótons geram um gradiente de prótons para a síntese de ATP. No exterior do anamoxossomo, os prótons são usados pela enzima redutora de nitrito, produzindo hidroxilamina e completando o ciclo. Todas as enzimas do processo anamox estão embebidas na membrana do anamoxossomo. [Fonte: informação de L. A. van Niftrik et al., *FEMS Microbiol. Lett.* 233:10, 2004, Fig. 4.]



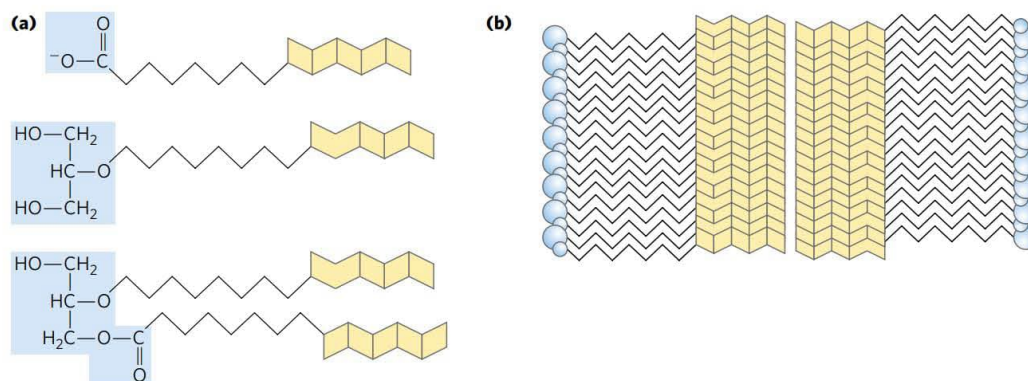


FIGURA Q-2 (a) Lipídeos laderanos da membrana do anamoxossomo. O mecanismo para a síntese das estruturas dos anéis ciclobutanos fundidos, que são instáveis, não é conhecido. (b) Os laderanos podem empilhar-se, formando uma membrana de estrutura muito densa, impermeável e hidrofóbica, permitindo o sequestro da hidrazina produzida nas reações anamox. [Fonte: informação de L. A. van Niftrik et al., *FEMS Microbiol. Lett.* 233:7, 2004, Fig. 3.]

das como pertencentes a um filo bacteriano incomum, o Planctomycetes. Algumas surpresas se seguiriam.

A bioquímica subjacente ao processo anamox foi lentamente descoberta (Figura Q-1). Hidrazina (N_2H_4), uma molécula altamente reativa utilizada como combustível em foguetes, surgiu como um intermediário inesperado. Sendo uma molécula pequena, a hidrazina é ao mesmo tempo altamente tóxica e difícil de conter. Ela se difunde facilmente através de membranas fosfolipídicas típicas. As bactérias anamox resolveram esse problema sequestrando a hidrazina em uma organela especializada, chamada de **anamoxossomo**. A membrana dessa organela é constituída por lipídeos conhecidos como **laderanos** (Figura Q-2), nunca antes encontrados na biologia. Os anéis de ciclobutanos fundidos apresentados pelos laderanos empilham-se de forma compacta, formando uma barreira muito densa e diminuindo muito a liberação de hidrazina. Os anéis de ciclobutano apresentam grande tensão e sua síntese é difícil; os mecanismos bacterianos para a síntese desses lipídeos ainda não são conhecidos.

Os anamoxossomos foram uma descoberta surpreendente. Células bacterianas geralmente não apresentam compartimentos e a ausência de um núcleo delimitado por membranas costuma ser citada como a principal diferença entre eucariotos e bactérias. Um tipo de organela em uma bactéria era suficientemente interessante, mas os microbiologistas também descobriram que os planctomicetos têm um núcleo: seu DNA cromossômico está contido dentro de uma membrana (Figura Q-3). Os planctomicetos representam uma antiga linhagem bacteriana com múltiplos gêneros, três dos quais são conhecidos por desenvolverem reações anamox. A descoberta dessa organização subcelular motivou novas pesquisas no sentido de desvendar a origem dos planctomicetos e a evolução do núcleo nos eucariotos. Estudos posteriores desse grupo de organismos poderão finalmente nos aproximar de um objetivo extremamente importante da biologia evolutiva: a descrição do orga-

nismo afetuosamente chamado de LUCA (do inglês, *last Universal common ancestor*) – o ancestral primordial comum de toda a vida em nosso planeta.

Por enquanto, as bactérias anamox fornecem uma grande vantagem para o tratamento de rejeitos, reduzindo o custo da remoção da amônia em até 90% (os passos convencionais de desnitrificação são completamente eliminados, e os custos da aeração, associada com a nitrificação, são reduzidos) e diminuindo a liberação de subprodutos poluentes. Claramente, uma maior familiaridade com os alicerces bacterianos da biosfera pode trazer bons resultados, à medida que os desafios ambientais do século XXI são enfrentados.

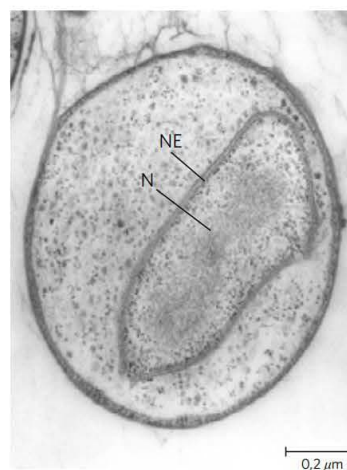


FIGURA Q-3 Micrografia eletrônica de transmissão de uma secção transversal de *Gemmata obscuriglobus*, mostrando o DNA em um núcleo (N) com envelope nuclear fechado (NE). Bactérias do gênero *Gemmata* (filo Planctomycetes) não realizam reações anamox. [Fonte: fornecido por John Fuerst de R. Lindsay et al., *Arch. Microbiol.* 175:413, 2001, Fig. 6a. © Springer-Verlag, 2001.]

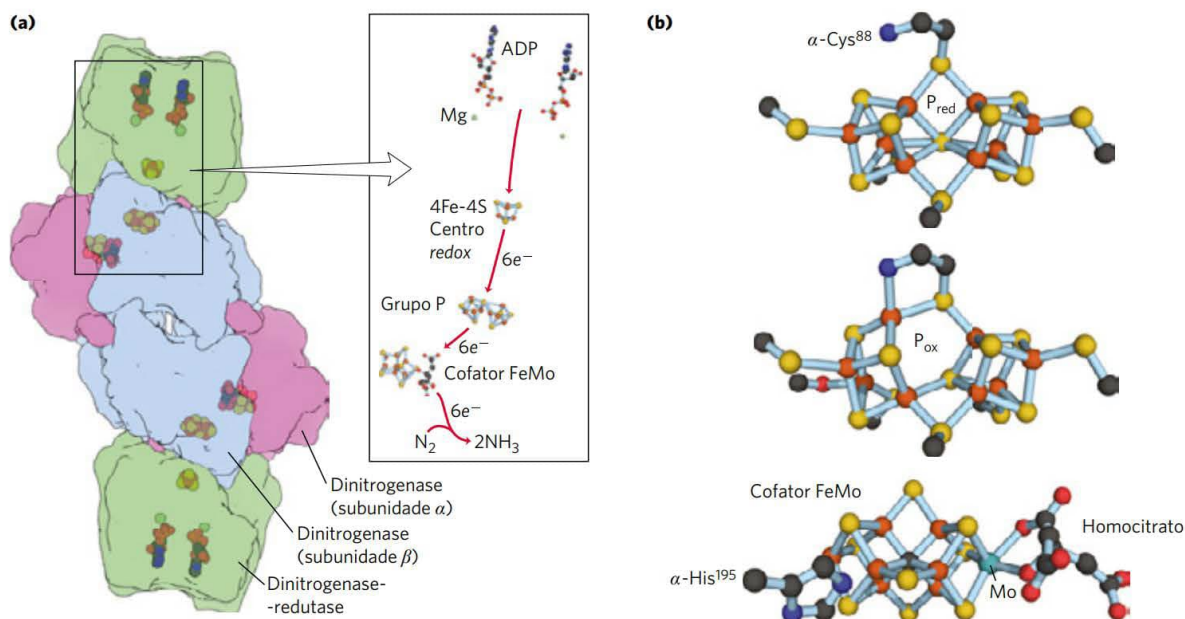


FIGURA 22-3 Enzimas e cofatores do complexo da nitrogenase. (a) A holoenzima consiste em duas moléculas idênticas de dinitrogenase-redutase (em verde), cada uma com um centro *redox* 4Fe-4S e sítios de ligação para dois ATP, e dois heterodímeros idênticos de dinitrogenases (em roxo e azul), cada um com um grupo P (centro Fe-S) e um cofator FeMo. Nesta estrutura, o ADP está ligado ao sítio do ATP, a fim de tornar o cristal mais estável. (b) Os cofatores para a transferência de elétrons. Um grupo P é mostrado aqui em suas formas reduzidas (parte superior) e oxidada (meio). O cofator FeMo (parte inferior) apresenta um átomo de Mo ligado a três S, uma His e dois átomos de oxigênio de uma molécula de homocitrato. Em alguns organismos, o átomo de Mo é substituído por um átomo de vanádio. (O Fe é mostrado em cor de laranja, o S, em amarelo.) [Fontes: (a) PDB ID 1N2C, H. Schindelin et al., *Nature* 387:370, 1997. (b) P_{red} : PDB ID 3MIN, e P_{ox} : PDB ID 2MIN, J. W. Peters et al., *Biochemistry* 36:1181, 1997; FeMo cofactor: PDB ID 1M1N, O. Einsle et al., *Science* 297:1696, 2002.]

ambientais. A nitrogenase contendo vanádio do *Azotobacter vinelandii* apresenta a notável capacidade de catalisar a redução do monóxido de carbono (CO) a etileno (C_2H_4), etano e propano.

A fixação de nitrogênio é realizada por uma forma de dinitrogenase altamente reduzida e requer oito elétrons: seis para a redução do N_2 e dois para a produção de uma molécula de H_2 . A produção de H_2 é parte obrigatória do mecanismo de reação, mas seu papel biológico no processo não é bem compreendido.

A dinitrogenase é reduzida pela transferência de elétrons a partir da dinitrogenase-redutase (Figura 22-4). O tetrâmero da dinitrogenase-redutase possui dois sítios de ligação para a redutase. Os oito elétrons necessários são transferidos, um a um, da redutase para a dinitrogenase: uma molécula de redutase reduzida liga-se à dinitrogenase, transfere um único elétron e, então, a redutase oxidada se dissocia da dinitrogenase, em um ciclo que se repete. Cada volta do ciclo requer a hidrólise de duas moléculas de ATP pela redutase dimérica. A fonte imediata de elétrons para a redução da dinitrogenase-redutase varia, podendo ser a **ferredoxina** reduzida (ver Seção 20.2), a flavodoxina reduzida e talvez outras fontes que também tenham um papel nessa redução. Em pelo menos uma espécie, a fonte primária de elétrons para reduzir a ferredoxina é o piruvato (Figura 22-4).

O papel do ATP nesse processo é, de certa forma, incomum. Como você deve lembrar, o ATP pode contribuir não apenas com energia química, resultante da hidrólise de uma ou mais de suas ligações fosfoanidrido, mas também com energia de ligação (p. 193), por meio de intera-

ções não covalentes, que diminuem a energia de ativação. Na reação catalisada pela dinitrogenase-redutase, tanto a ligação do ATP quanto sua hidrólise determinam alterações conformacionais na proteína que ajudam a superar a alta energia de ativação da fixação do nitrogênio. A ligação de duas moléculas de ATP à redutase desloca o potencial de redução (E'^0) dessa proteína de -300 para -420 mV, e esse aumento de poder redutor é necessário para a transferência de elétrons pela dinitrogenase até o N_2 ; o potencial de redução padrão para a hemirreação $N_2 + 6H^+ + 6e^- \rightarrow 2NH_3$ é $-0,34$ V. As moléculas de ATP são, então, hidrolisadas imediatamente antes da transferência de fato de um elétron para a dinitrogenase.

A ligação e a hidrólise do ATP mudam a conformação da nitrogenase-redutase em duas regiões, as quais são estruturalmente homólogas às regiões comutadoras 1 e 2 de proteínas ligantes de GTP envolvidas na sinalização biológica (ver Quadro 12-1). A ligação do ATP produz uma alteração conformacional que traz o centro 4Fe-4S da redutase para mais próximo ao grupo P da dinitrogenase (de uma distância de 18 \AA para 14 \AA), o que facilita a transferência de elétrons entre a redutase e a dinitrogenase. Os detalhes da transferência de elétrons do grupo P para o cofator FeMo e os meios pelos quais oito elétrons são acumulados pela nitrogenase não são conhecidos. Tampouco os intermediários da reação são conhecidos com certeza; duas hipóteses razoáveis estão sendo testadas, ambas envolvendo o átomo de Mo em um papel central (Figura 22-5).

O complexo nitrogenase é notavelmente instável na presença de oxigênio. A redutase é inativada pelo ar, com meia-

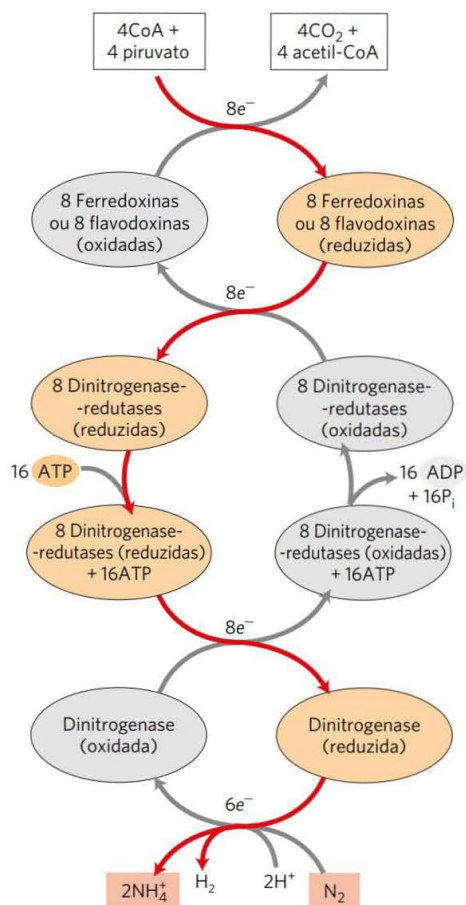


FIGURA 22-4 Fluxo de elétrons na fixação do nitrogênio pelo complexo da nitrogenase. Os elétrons são transferidos do piruvato para a dinitrogenase via ferredoxina (ou flavodoxina) e dinitrogenase-redutase. A dinitrogenase-redutase reduz a dinitrogenase, que recebe um elétron de cada vez, sendo necessários pelo menos seis elétrons para fixar uma molécula de N_2 . Dois elétrons adicionais são usados para reduzir $2H^+$ para H_2 em um processo que acompanha obrigatoriamente a fixação de nitrogênio em anaeróbios, perfazendo um total de oito elétrons necessários por molécula de N_2 . As estruturas das subunidades e os cofatores metálicos das proteínas dinitrogenase-redutase e dinitrogenase estão descritos no texto e na Figura 22-3.

-vida de 30 segundos; a dinitrogenase apresenta meia-vida de apenas 10 minutos na presença de ar. Bactérias de vida livre que fixam nitrogênio lidam com esse problema de diversas formas. Algumas vivem apenas anaerobicamente ou reprimem a síntese da nitrogenase quando o oxigênio estiver presente. Algumas espécies aeróbicas, como o *Azotobacter vinelandii*, desacoplam parcialmente a transferência de elétrons da síntese de ATP, de modo que o oxigênio é gasto tão rapidamente quanto entra na célula (ver Quadro 19-2). Quando fazem fixação de nitrogênio, culturas dessas bactérias induzem um aumento real da temperatura, como resultado de seus esforços para se livrar do oxigênio.

A relação simbiótica entre plantas leguminosas e bactérias fixadoras de nitrogênio nos nódulos de suas raízes (**Figura 22-6**) engloba os dois problemas do complexo da nitrogenase: as necessidades de energia e a labilidade frente ao oxigênio. É provável que a energia necessária para a

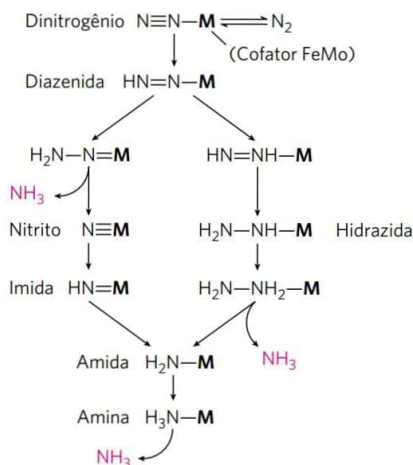


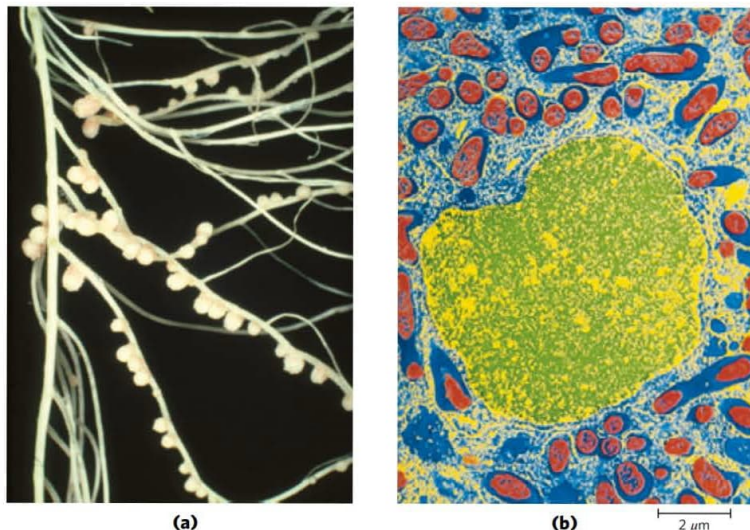
FIGURA 22-5 Duas hipóteses razoáveis para os intermediários envolvidos na redução de N_2 . Em ambos os cenários, o cofator FeMo (aqui abreviado como **M**) desempenha um papel central, ligando-se diretamente a um dos átomos de nitrogênio do N_2 , e permanecendo ligado durante toda a sequência de etapas redutoriais. [Fonte: informação de L. C. Seefeldt et al., *Annu. Rev. Biochem.* 78:701, 2009, Fig. 9.]

fixação do nitrogênio tenha sido a força que evolutivamente levou a essa associação entre planta e bactéria. As bactérias nos nódulos das raízes têm acesso a um grande reservatório de energia na forma de abundantes carboidratos e intermediários do ciclo do ácido cítrico, disponibilizados pela planta. Isso pode permitir à bactéria fixar nitrogênio em quantidades centenas de vezes maiores que o fazem suas primas de vida livre, nas condições normalmente encontradas no solo. Para resolver o problema da toxicidade pelo oxigênio, as bactérias nos nódulos das raízes ficam banhadas em uma solução contendo uma hemoproteína ligadora de oxigênio, a **leg-hemoglobina**, produzida pela planta (embora o heme possa ser fornecido pelas bactérias). A leg-hemoglobina liga todo o oxigênio disponível, de modo que ele não pode interferir na fixação do nitrogênio, e libera de maneira eficiente o oxigênio junto ao sistema de transferência de elétrons bacteriano. O benefício para a planta, naturalmente, é um farto suprimento de nitrogênio reduzido. De fato, os simbioses bacterianos geralmente produzem muito mais NH_3 do que o necessário para seu parceiro simbiote; o excesso é liberado para o solo. A eficiência da simbiose entre plantas e bactérias torna-se evidente no enriquecimento do nitrogênio do solo, realizado por plantas leguminosas. Esse enriquecimento da NH_3 no solo é a base dos métodos de rotação de culturas, nos quais o cultivo de plantas não leguminosas (como o milho), que extraem do solo o nitrogênio fixado, é alternado a cada poucos anos com o cultivo de leguminosas, como alfafa, ervilhas ou trevo.

A fixação do nitrogênio é um processo energeticamente dispendioso: 16 moléculas de ATP e 8 pares de elétrons produzem apenas 2 NH_3 . Desse modo, não é de surpreender que o processo seja estritamente regulado, de modo que a NH_3 é produzida apenas quando necessário. Alta [ADP], um indicador de baixa [ATP], inibe fortemente a nitrogenase. O NH_4^+ reprime a expressão de aproximadamente 20 genes de fixação de nitrogênio (*nif*), inibindo efetivamente a via. A alteração covalente da nitrogenase é também utilizada por

FIGURA 22-6 Nódulos fixadores de nitrogênio.

(a) Nódulos de raízes da ervilha (*Pisum sativum*) contendo a bactéria fixadora de nitrogênio *Rhizobium leguminosarum*. Os nódulos são rosados devido à presença de leg-hemoglobina; esta hemoproteína tem uma afinidade de ligação muito alta pelo oxigênio, que inibe fortemente a nitrogenase. (b) Micrografia eletrônica colorida artificialmente de uma fina seção transversal de um nódulo da raiz de ervilhas. Bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio, ou bacteroides (em vermelho), vivem no interior da célula nodular, circundadas pela membrana peribacterioide (em azul). Os bacteroides produzem o complexo nitrogenase, que converte nitrogênio atmosférico (N_2) em amônio (NH_4^+); sem os bacteroides, a planta é incapaz de utilizar N_2 . (O núcleo celular é mostrado em amarelo/verde. Outras organelas da célula infectada da raiz normalmente encontradas em células vegetais não estão visíveis nesta micrografia.) [Fonte: (a, b) Jeremy Burgess/Science Source.]



alguns seres diazotróficos para controlar a fixação do nitrogênio em resposta à disponibilidade de NH_4^+ nas proximidades. Por exemplo, a transferência de um grupo ADP-ribosila a partir de um NADH para um resíduo específico de Arg na nitrogenase-redutase inibe a fixação do N_2 no *Rhodospirillum*. Essa é a mesma modificação covalente vista no caso da inibição da proteína G pelas toxinas do cólera e pertússis (ver Quadro 12-1).

A fixação do nitrogênio é alvo de intensos estudos devido à sua imensa importância prática. A produção industrial de amônia para utilização em fertilizantes requer um grande e dispendioso fornecimento de energia, e isso tem estimulado esforços no sentido de desenvolver organismos recombinantes ou transgênicos que possam fixar nitrogênio. Em princípio, técnicas de DNA recombinante (Capítulo 9) poderiam ser utilizadas para transferir DNA que codifica enzimas da fixação de nitrogênio para bactérias e plantas não fixadoras de nitrogênio. Contudo, apenas a transferência desses genes não será suficiente. Cerca de 20 genes são essenciais para a atividade da nitrogenase nas bactérias, muitos deles necessários para a síntese, reunião e inserção de cofatores. Há também o problema de proteger a enzima em seu novo ambiente da destruição pelo oxigênio. No conjunto, há enormes desafios na engenharia da produção de novas plantas fixadoras de nitrogênio. O sucesso desses esforços dependerá de se conseguir contornar o problema da toxicidade do oxigênio em qualquer célula que produza a nitrogenase.

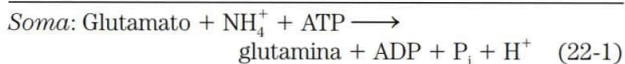
A amônia é incorporada em biomoléculas via glutamato e glutamina

O nitrogênio reduzido, na forma de NH_4^+ , é incorporado nos aminoácidos e, em seguida, em outras biomoléculas nitrogenadas. Dois aminoácidos, **glutamato** e **glutamina**, fornecem um ponto de entrada crucial. Lembre-se de que esses mesmos dois aminoácidos desempenham papéis centrais no catabolismo da amônia e dos grupos amino na oxidação dos aminoácidos (Capítulo 18). O glutamato é fonte de grupos amina para a maior parte dos demais aminoácidos, por meio de reações de transaminação (o reverso da reação mostrada na Figura 18-4). O nitrogênio amídico da glutamina é

fonte de grupos amina em uma ampla gama de processos biossintéticos. Na maioria dos tipos celulares e nos líquidos extracelulares dos organismos superiores, um desses aminoácidos ou ambos estão presentes em concentrações mais elevadas – algumas vezes de uma ordem de magnitude ou até mais – que outros aminoácidos. Uma célula de *Escherichia coli* necessita de tanto glutamato que esse aminoácido é um dos principais solutos no citosol. Sua concentração é regulada não apenas em resposta às necessidades de nitrogênio na célula, mas também em função da manutenção de um balanço osmótico entre o citosol e o meio externo.

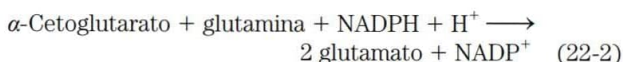
As vias biossintéticas para a produção de glutamato e glutamina são simples, e todos os passos ou alguns deles ocorrem na maioria dos organismos. A via mais importante para a incorporação de NH_4^+ em glutamato é constituída por duas reações. Inicialmente, a **glutamina-sintetase** catalisa a reação entre glutamato e NH_4^+ , produzindo glutamina. Essa reação ocorre em duas etapas, com o γ -glutamil-fosfato ligado à enzima como intermediário (ver Figura 18-8):

- (1) Glutamato \longrightarrow γ -glutamil-fosfato + ADP
- (2) γ -Glutamil-fosfato + NH_4^+ \longrightarrow glutamina + P_i + H^+

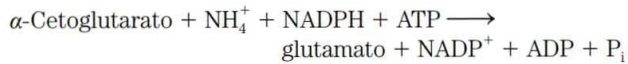


A glutamina-sintetase é encontrada em todos os organismos. Além de sua importância para a incorporação de NH_4^+ em bactérias, esse aminoácido tem um papel central no metabolismo de aminoácidos em mamíferos, convertendo NH_4^+ livre, que é tóxico, em glutamina, para transporte pelo sangue (Capítulo 18).

Em bactérias e plantas, o glutamato é produzido a partir da glutamina em uma reação catalisada pela **glutamato-sintase**. (O nome alternativo dessa enzima é glutamato:oxoglutarato-aminotransferase, que origina o acrônimo GOGAT, pelo qual a enzima também é conhecida.) O α -cetoglutarato, intermediário do ciclo do ácido cítrico, sofre aminação redutora, com a glutamina como doador de nitrogênio:

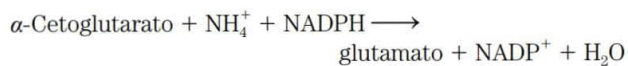


A reação líquida global, considerando a glutamina-sintetase e a glutamato-sintase (Equações 22-1 e 22-2), é



A glutamato-sintase não está presente em animais, os quais, por outro lado, mantêm altos níveis de glutamato por meio de processos como a transaminação do α -cetoglutarato durante o catabolismo dos aminoácidos.

O glutamato também pode ser formado por meio de outra via, embora de menor importância: a reação entre α -cetoglutarato e NH_4^+ , formando glutamato em uma única etapa. Essa reação é catalisada pela glutamato-desidrogenase, uma enzima presente em todos os organismos. Os equivalentes redutores são fornecidos pelo NADPH:



Essa reação já foi estudada no catabolismo dos aminoácidos (ver Figura 18-7). Em células eucarióticas, a glutamato-desidrogenase localiza-se na matriz mitocondrial. O equilíbrio da reação favorece os reagentes, e o K_m para o NH_4^+ (~ 1 mM) é tão alto que a reação provavelmente tenha apenas uma contribuição modesta para a captação de NH_4^+ em aminoácidos e outros metabólitos. (Lembre-se de que a reação da glutamato-desidrogenase, no sentido inverso [ver Figura 18-10], é uma fonte do NH_4^+ destinado ao ciclo da ureia.) Concentrações de NH_4^+ suficientemente altas para que a reação da glutamato-desidrogenase tenha uma contribuição significativa para os níveis de glutamato geralmente ocorrem apenas quando NH_3 é adicionado ao solo ou quando os organismos crescem em laboratório, na presença de altas concentrações de NH_3 . Em geral, as bactérias e plantas do solo dependem da via de duas enzimas descrita acima (Equações 22-1, 22-2).

A reação da glutamina-sintetase é um ponto importante de regulação no metabolismo do nitrogênio

A atividade da glutamina-sintetase é regulada em praticamente todos os organismos, o que não é surpreendente, dado seu papel metabólico central como ponto de entrada para o nitrogênio reduzido. Em bactérias entéricas, como a *E. coli*, a regulação é incomumente complexa. A enzima tipo I (de bactérias) apresenta 12 subunidades idênticas de M_r 50.000 (Figura 22-7) e é regulada tanto alostericamente quanto por modificação covalente. (A enzima tipo II, de eucariotos e de algumas bactérias, tem 10 subunidades idênticas.) A alanina, a glicina e pelo menos seis produtos finais do metabolismo da glutamina são inibidores alostéricos da enzima (Figura 22-8). Cada inibidor por si só produz apenas uma inibição parcial, mas os efeitos de múltiplos inibidores são mais que aditivos e todos os oito em conjunto praticamente “desligam” a enzima. Esse é um exemplo de inibição por retroalimentação cumulativa. Esse mecanismo de controle fornece um ajuste constante dos níveis de glutamina, de forma a satisfazer as necessidades metabólicas imediatas da célula.

Sobreposta à regulação alostérica, está a inibição por adenilação (adição de AMP) da Tyr³⁹⁷, localizada próxima ao sítio ativo da enzima (Figura 22-9). Essa modificação

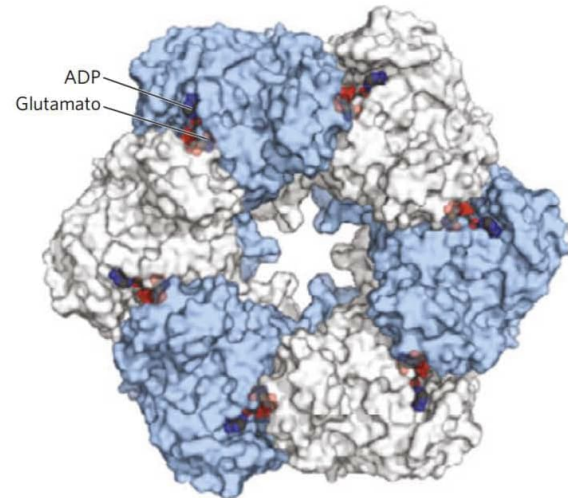


FIGURA 22-7 Subunidades estruturais da glutamina-sintetase bacteriana tipo I. Esta imagem mostra 6 das 12 subunidades idênticas; uma segunda camada de 6 subunidades está diretamente abaixo das mostradas. Cada uma das 12 subunidades tem um sítio ativo onde ATP e glutamato são ligados em orientações que favorecem a transferência de um grupo fosforila do ATP para a carboxila da cadeia lateral do glutamato. Nesta estrutura cristalina, o ADP ocupa o lugar do ATP. [Fonte: PDB ID 2GLS, M. M. Yamashita et al., *J. Biol. Chem.* 264:17,681, 1989.]

covalente aumenta a sensibilidade aos inibidores alostéricos, e a atividade diminui à medida que mais subunidades vão sendo adeniladas. Tanto a adenilação quanto a desadenilação são realizadas pela **adenilil-transferase** (AT na Figura 22-9), parte de uma cascata enzimática complexa que responde aos níveis de glutamina, α -cetoglutarato, ATP e P_i . A atividade da adenilil-transferase é modulada

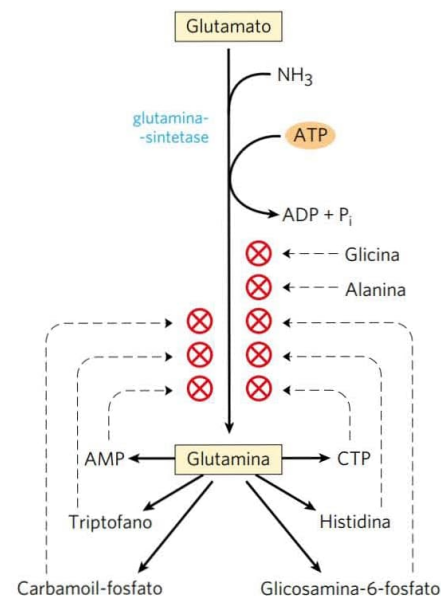


FIGURA 22-8 Regulação alostérica da glutamina-sintetase. A enzima está sujeita à regulação cumulativa por seis produtos finais do metabolismo da glutamina. A alanina e a glicina provavelmente atuam como indicadores do estado geral do metabolismo dos aminoácidos na célula.

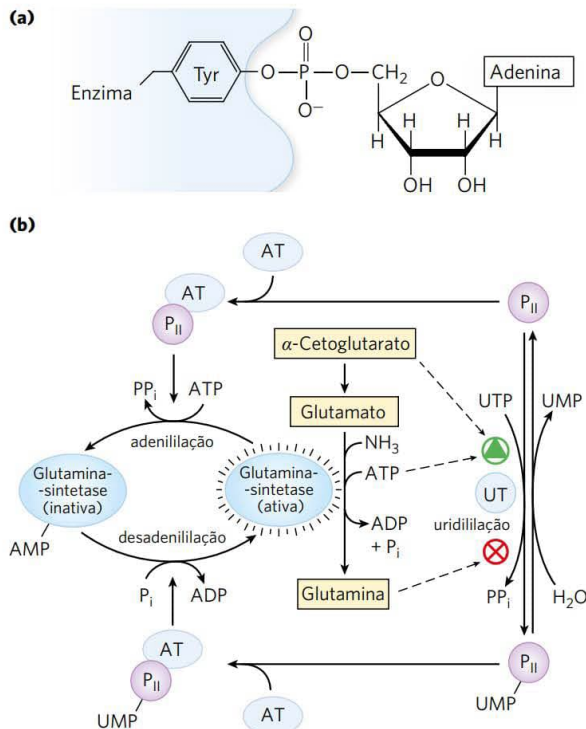


FIGURA 22-9 Segundo nível de regulação da glutamina-sintetase: modificações covalentes. (a) Um resíduo de tirosina adenilado. (b) Cascata levando à adenililação (inativação) da glutamina-sintetase. AT representa adenilil-transferase; UT, uridilil-transferase. P_{II} é uma proteína reguladora, sendo autorregulada por uridilação. Detalhes dessa cascata são discutidos no texto.

pela ligação a uma proteína reguladora, denominada P_{II}, e a atividade da P_{II}, por sua vez, é regulada por modificação covalente (uridilação), novamente em um resíduo de Tyr. O complexo entre adenilil-transferase e P_{II} uridililada (P_{II}-UMP) estimula a desadenilação, ao passo que o mesmo complexo, com a P_{II} desuridilada, estimula a adenilação da glutamina-sintetase. Tanto a uridilação quanto a desuridilação da P_{II} são catalisadas por uma única enzima, a **uridilil-transferase**. A uridilação é inibida pela ligação de glutamina e P_i à uridilil-transferase e é estimulada pela ligação de α-cetoglutarato e ATP à P_{II}.

A regulação não cessa nesse ponto. A P_{II} uridililada também controla a ativação da transcrição do gene que codifica a glutamina-sintetase, aumentando a concentração celular da enzima; a P_{II} desuridilada, por sua vez, determina uma diminuição na transcrição do mesmo gene. O mecanismo envolve uma interação da P_{II} com outras proteínas envolvidas na regulação gênica, de um tipo descrito no Capítulo 28. O resultado final desse elaborado sistema de controle é uma diminuição na atividade da glutamina-sintetase quando os níveis de glutamina estão altos e um aumento nessa atividade enzimática quando os níveis de glutamina estão baixos e houver disponibilidade de α-cetoglutarato e ATP (substratos da reação da sintetase). Os vários níveis de regulação permitem uma resposta de grande sensibilidade, em que a síntese de glutamina se ajusta às necessidades celulares.

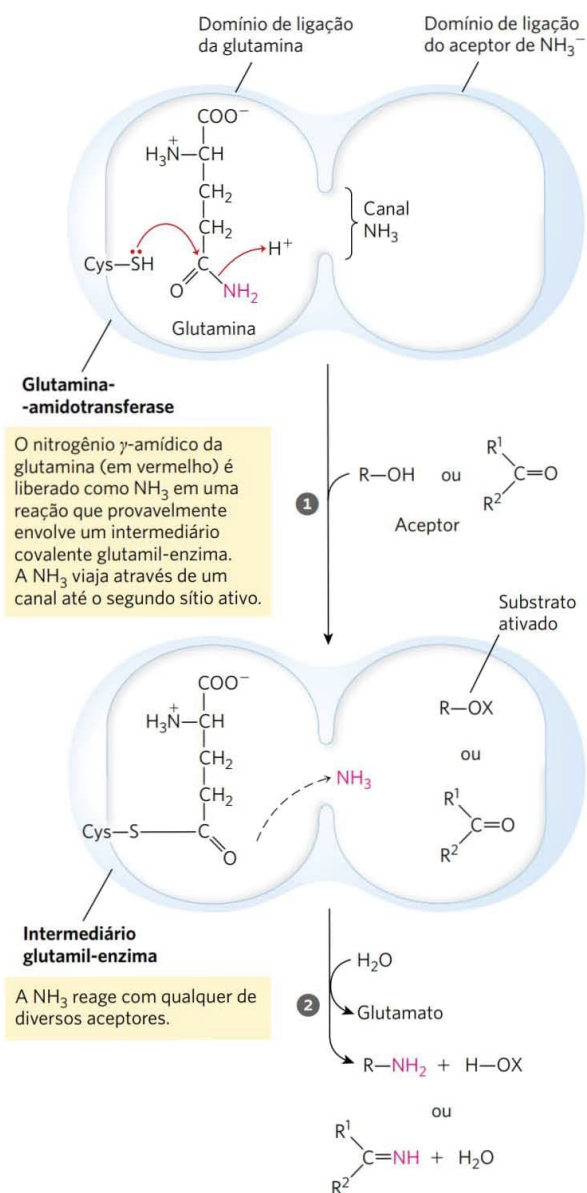
Diversas classes de reações desempenham papéis especiais na biossíntese de aminoácidos e nucleotídeos

As vias descritas neste capítulo incluem uma série de rearranjos químicos interessantes. Diversos deles são recorrentes e receberão especial atenção antes do estudo das vias em si. Eles incluem (1) reações de transaminação e outros rearranjos promovidos por enzimas contendo piridoxal-fosfato; (2) transferência de grupos de um carbono, utilizando como cofatores tetra-hidrofolato (em geral nos níveis de oxidação —CHO e —CH₂OH) ou S-adenosilmetionina (no nível de oxidação —CH₃); e (3) transferência de grupos amina derivados do nitrogênio amídico da glutamina. Piridoxal-fosfato (PLP), tetra-hidrofolato (H₄-folato) e S-adenosilmetionina (adoMet) são descritos com detalhes no Capítulo 18 (ver Figuras 18-6, 18-17 e 18-18). Aqui, será focalizado o estudo da transferência de grupos amina envolvendo o nitrogênio amídico da glutamina.

Mais de doze reações biossintéticas conhecidas utilizam a glutamina como a principal fonte fisiológica de grupos amina, a maioria delas ocorrendo nas vias descritas neste capítulo. Como classe, as enzimas que catalisam essas reações são denominadas **glutamina-amidotransferases**. Todas elas apresentam dois domínios estruturais: um deles liga a glutamina e o outro liga o segundo substrato, que serve como aceptor do grupo amina (Figura 22-10). Supõe-se que um resíduo de Cys conservado no domínio onde ocorre a ligação da glutamina atue como nucleófilo, clivando a ligação amida da glutamina e formando um intermediário glutamyl-enzima covalentemente ligado. A NH₃ produzida nessa reação não é liberada, mas sim transferida por meio de um “canal de amônia” a um segundo sítio ativo, onde reage com o segundo substrato, formando um produto aminado. O intermediário covalente é hidrolisado, liberando a enzima livre e o glutamato. Se o segundo substrato precisar ser ativado, o método geral é a utilização de ATP para gerar um intermediário acil-fosfato (R—OX na Figura 22-10, em que X é o grupo fosforila). A enzima glutaminase atua de modo semelhante, mas utiliza H₂O como o segundo substrato, produzindo NH₄⁺ e glutamato (ver Figura 18-8).

RESUMO 22.1 Visão geral do metabolismo do nitrogênio

- O nitrogênio molecular, que constitui 80% do nitrogênio da atmosfera da Terra, encontra-se indisponível para a maior parte dos organismos vivos até que seja reduzido. A fixação do N₂ atmosférico ocorre em certas bactérias de vida livre e em bactérias simbióticas nos nódulos das raízes de plantas leguminosas.
- Em bactérias do solo e em plantas vasculares, a ação sequencial da nitrato-redutase e da nitrito-redutase converte o NO₃⁻ em NH₃, que pode ser assimilada em compostos contendo nitrogênio.
- O ciclo do nitrogênio permite a formação de amônia pela fixação bacteriana do N₂, a nitrificação da amônia em nitrato por organismos no solo, a conversão do nitrato em amônia por plantas superiores, a síntese de aminoácidos a partir da amônia por todos os organismos e a conversão de nitrato em N₂ por bactérias desnitrificantes do solo. As bactérias anamox oxidam anaerobicamente a amônia em nitrogênio, utilizando nitrito como aceptor de elétrons.



MECANISMO-FIGURA 22-10 Mecanismo proposto para as glutamina-amidotransferases. Cada molécula de enzima apresenta dois domínios. O domínio que tem o sítio de ligação para a glutamina contém elementos estruturais conservados entre muitas destas enzimas, incluindo um resíduo de Cys necessário para a atividade. O domínio de ligação do aceptor de NH_3 (segundo substrato) varia. São mostrados dois tipos de aceptores de grupos amina. X representa um grupo ativador, geralmente um grupo fosforila derivado do ATP, que facilita o deslocamento, pela NH_3 , de um grupo hidroxila do $\text{R}-\text{OH}$.

- A fixação de N_2 como NH_3 é realizada pelo complexo da nitrogenase, em uma reação que requer um grande investimento de ATP e de poder redutor. O complexo da nitrogenase é altamente lábil na presença de O_2 e está sujeito a regulação pela disponibilidade de NH_3 .
- Nos sistemas vivos, o nitrogênio reduzido é inicialmente incorporado nos aminoácidos e, a seguir, em uma variedade de outras biomoléculas, incluindo os nucleo-

tídeos. O ponto-chave para essa entrada do nitrogênio é o aminoácido glutamato. O glutamato e a glutamina são doadores de nitrogênio em uma ampla gama de reações biossintéticas. A glutamina-sintetase, que catalisa a formação de glutamina a partir do glutamato, é uma importante enzima reguladora do metabolismo do nitrogênio.

- As vias biossintéticas dos aminoácidos e dos nucleotídeos utilizam repetidamente os cofatores biológicos piridoxal-fosfato, tetra-hidrofolato e *S*-adenosilmetionina. O piridoxal-fosfato é necessário para reações de transaminação envolvendo o glutamato e para outras transformações dos aminoácidos. Transferências de grupos de um carbono necessitam de *S*-adenosilmetionina e tetra-hidrofolato. Glutamina-amidotransferases catalisam reações que incorporam o nitrogênio derivado da glutamina.

22.2 Biossíntese de aminoácidos

Todos os aminoácidos são derivados de intermediários da glicólise, do ciclo do ácido cítrico ou da via das pentoses-fosfato (**Figura 22-11**). O nitrogênio entra nessas vias por

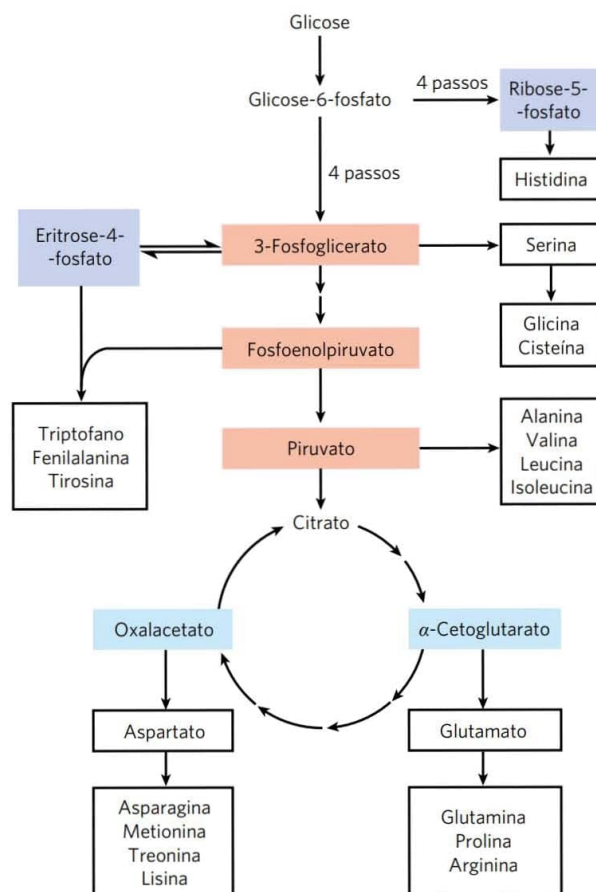


FIGURA 22-11 Visão geral da biossíntese de aminoácidos. Os precursores dos esqueletos carbonados são obtidos a partir de três fontes: a glicólise (em cor salmão), o ciclo do ácido cítrico (em azul) e a via das pentoses-fosfato (em roxo).

TABELA 22-1 Família de vias de biossíntese de aminoácidos agrupados de acordo com o precursor metabólico

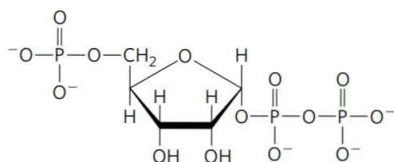
α-Cetoglutarato	Piruvato
Glutamato	Alanina
Glutamina	Valina ^a
Prolina	Leucina ^a
Arginina	Isoleucina ^a
3-Fosfoglicerato	Fosfoenolpiruvato-1,3-bisfosfoglicerato e eritrose 4-fosfato
Serina	Triptofano ^a
Glicina	Fenilalanina ^a
Cisteína	Tirosina ^b
Oxalacetato	Ribose-5-fosfato
Aspartato	Histidina ^a
Asparagina	
Metionina ^a	
Treonina ^a	
Lisina ^a	

^aAminoácidos essenciais em mamíferos.^bDerivado da fenilalanina em mamíferos.

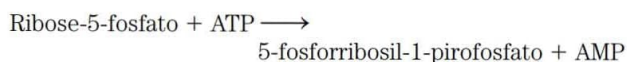
meio do glutamato ou da glutamina. Algumas vias são simples, outras não. Dez dos aminoácidos estão a apenas um ou a poucos passos dos metabólitos comuns dos quais são derivados. As vias biossintéticas para outros aminoácidos, como os aminoácidos aromáticos, são mais complexas.

Os organismos variam muito em suas capacidades de sintetizar os 20 aminoácidos comuns. Enquanto a maioria das bactérias e das plantas pode sintetizar todos os 20, os mamíferos podem sintetizar apenas cerca de metade deles – geralmente aqueles com vias simples. Estes são frequentemente chamados de **aminoácidos não essenciais** (ver Tabela 18-1). O rótulo é um pouco enganador, no entanto, porque as vias biossintéticas inatas muitas vezes não fornecem quantidade suficiente desses aminoácidos para apoiar o crescimento e a saúde ideais. Os aminoácidos restantes, os **aminoácidos essenciais**, não podem ser sintetizados pela maioria dos animais e devem ser obtidos a partir de alimentos. A não ser que esteja indicado, as vias para os 20 aminoácidos comuns apresentadas a seguir são aquelas operantes nas bactérias.

Uma forma útil de organizar essas vias biossintéticas é agrupá-las em seis famílias correspondentes aos seus precursores metabólicos (Tabela 22-1), e essa abordagem será utilizada para estruturar as descrições detalhadas a seguir. Além desses seis precursores, há um intermediário notável em diversas vias de síntese de aminoácidos e nucleotídeos: o **5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP)**:

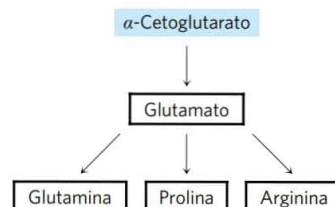


O PRPP é sintetizado a partir da ribose-5-fosfato, obtida da via das pentoses-fosfato (ver Figura 14-22), em reação catalisada pela **ribose-fosfato-pirofosfocinase**:



Essa enzima é regulada alostericamente por muitas das biomoléculas para as quais o PRPP é um precursor.

O α -cetoglutarato origina glutamato, glutamina, prolina e arginina



Já foram descritas as biossínteses do **glutamato** e da **glutamina**. A **prolina** é um derivado cíclico do glutamato (**Figura 22-12**). Na primeira etapa da síntese da prolina, ATP reage com a γ -carboxila do glutamato, formando um acil-fosfato, que é reduzido por NADPH ou NADH, produzindo o γ -semialdeído do glutamato. Esse intermediário sofre uma ciclização rápida e espontânea, sendo novamente reduzido para produzir prolina.

A **arginina** é sintetizada a partir do glutamato, via ornitina, usando reações do ciclo da ureia nos animais (Capítulo 18). Em princípio, a ornitina também pode ser sintetizada a partir do glutamato γ -semialdeído por transaminação, mas a ciclização espontânea do semialdeído na via da prolina impede uma oferta suficiente deste intermediário para a síntese da ornitina. As bactérias apresentam uma via biossintética *de novo* para a ornitina (e, portanto, para a arginina), paralela a algumas etapas da via da prolina, mas inclui duas etapas adicionais, que evitam o problema da ciclização espontânea do γ -semialdeído do glutamato (Figura 22-12). Na primeira etapa, o grupo α -amina do glutamato é bloqueado por uma acetilação, para a qual é utilizada a acetil-CoA; depois, após o passo de transaminação, o grupo acetil é removido para produzir ornitina.

As vias para a produção de prolina e arginina são um pouco diferentes nos mamíferos. A prolina pode ser sintetizada pela via mostrada na Figura 22-12, mas também é produzida a partir da arginina obtida da dieta ou de proteínas teciduais. A arginase, enzima do ciclo da ureia, converte arginina em ornitina e ureia (ver Figuras 18-10 e 18-26). A ornitina é convertida no γ -semialdeído do glutamato pela enzima **ornitina δ -aminotransferase** (**Figura 22-13**). O semialdeído cicliza, produzindo Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato, o qual é, então, convertido em prolina (Figura 22-12). A via mostrada na Figura 22-12 para a síntese de arginina não ocorre em mamíferos. Quando a arginina obtida da dieta ou da renovação de proteínas for insuficiente para a síntese proteica, a reação da ornitina- δ -aminotransferase opera no sentido da formação de ornitina. A ornitina é, então, convertida em citrulina e arginina pelo ciclo da ureia.

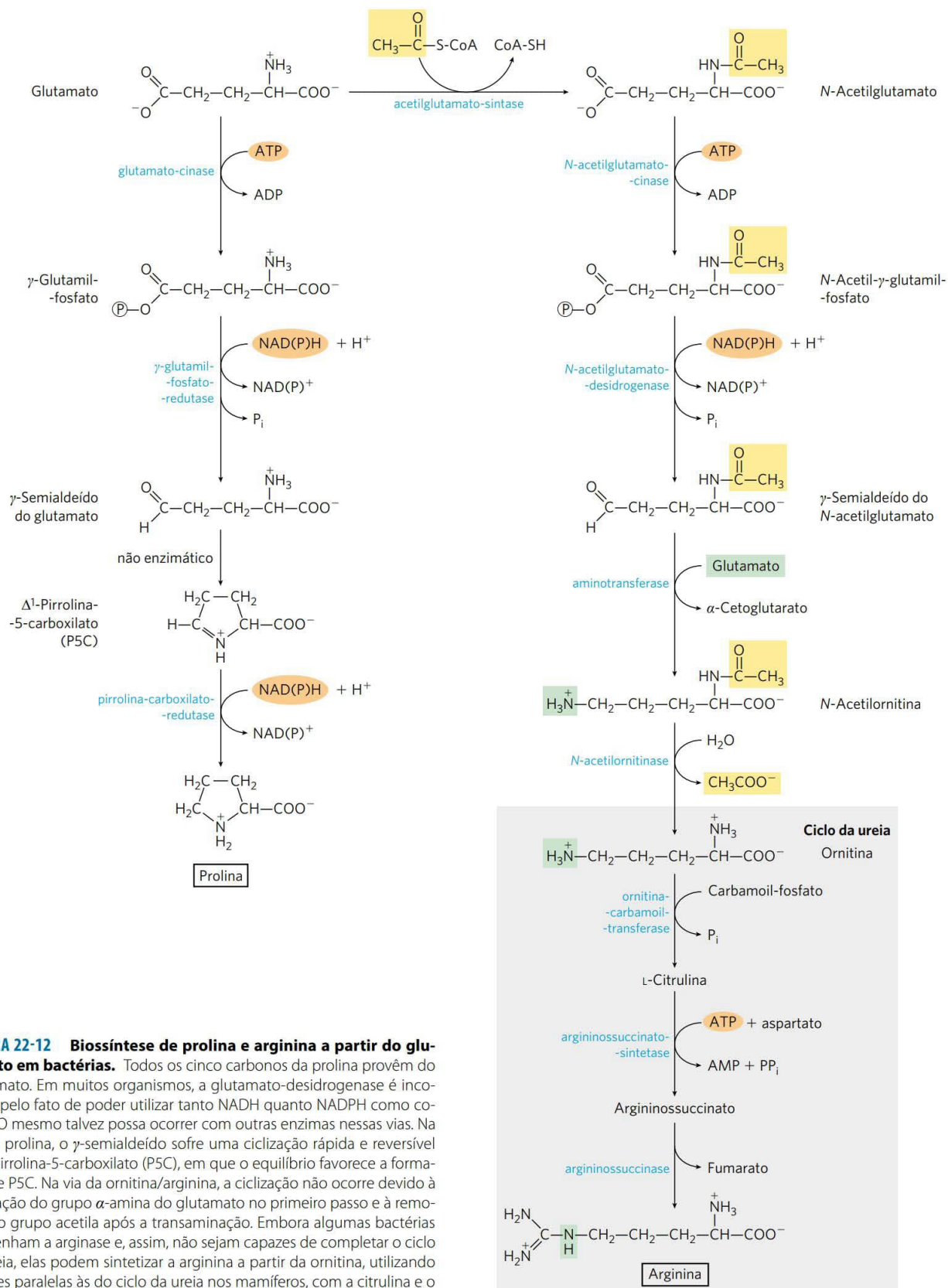


FIGURA 22-12 Biossíntese de prolina e arginina a partir do glutamato em bactérias. Todos os cinco carbonos da prolina provém do glutamato. Em muitos organismos, a glutamato-desidrogenase é incomum pelo fato de poder utilizar tanto NADH quanto NADPH como cofator. O mesmo talvez possa ocorrer com outras enzimas nessas vias. Na via da prolina, o γ -semialdeído sofre uma ciclização rápida e reversível a Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato (P5C), em que o equilíbrio favorece a formação de P5C. Na via da ornitina/arginina, a ciclização não ocorre devido à acetilação do grupo α -amina do glutamato no primeiro passo e à remoção do grupo acetila após a transaminação. Embora algumas bactérias não tenham a arginase e, assim, não sejam capazes de completar o ciclo da ureia, elas podem sintetizar a arginina a partir da ornitina, utilizando reações paralelas às do ciclo da ureia nos mamíferos, com a citrulina e o argininossuccinato como intermediários (ver Figura 18-10).

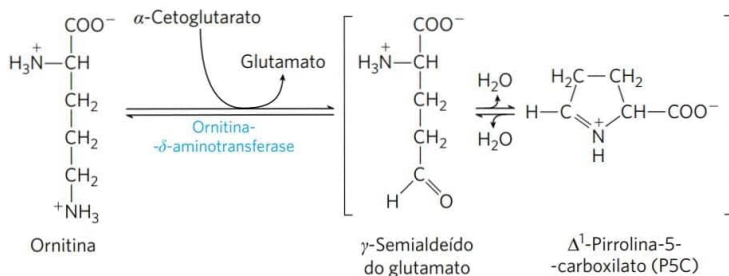
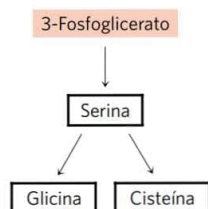


FIGURA 22-13 Reação da ornitina- δ -aminotransferase: um passo na via para a prolina em mamíferos. Esta enzima é encontrada na matriz mitocondrial da maioria dos tecidos. Embora o equilíbrio favoreça a formação do P5C, a reação reversa é a única via para a síntese da ornitina (e, portanto, da arginina) em mamíferos quando os níveis de arginina forem insuficientes para a síntese proteica.

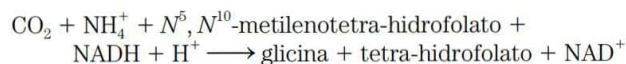
Aqui e nas figuras seguintes deste capítulo, as setas nas reações indicam a via linear até os produtos finais, sem considerar a reversibilidade dos passos individuais. Por exemplo, nesta via, o passo que leva à arginina, catalisado pela *N*-acetilglutamato-desidrogenase, é quimicamente similar à reação da gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase na glicólise (ver Figura 14-8) e é facilmente reversível.

Serina, glicina e cisteína são derivadas do 3-fosfoglicerato



A principal via para a produção de **serina** é a mesma em todos os organismos (Figura 22-14). No primeiro passo, o grupo hidroxila do 3-fosfoglicerato é oxidado por uma desidrogenase (utilizando NAD^+), produzindo 3-fosfo-hidroxipiruvato. Uma transaminação utilizando glutamato produz 3-fosfosserina, que, então, é hidrolisada em serina livre pela fosfosserina-fosfatase.

A serina (três carbonos) é precursora da **glicina** (dois carbonos), pela remoção de um átomo de carbono pela **serina-hidroximetil-transferase** (Figura 22-14). O tetra-hidrofolato recebe o carbono β (C-3) da serina, que forma uma ponte metileno entre N-5 e N-10, originando N^5, N^{10} -metilenotetra-hidrofolato (ver Figura 18-17). A reação global, que é reversível, também requer piridoxal-fosfato. No fígado de vertebrados, a glicina pode ser produzida por outra via: a reação reversa daquela mostrada na Figura 18-20c, catalisada pela **glicina-sintase** (também denominada **enzima de clivagem da glicina**):



Plantas e bactérias produzem o enxofre reduzido necessário para a síntese de **cisteína** (e de metionina, cuja síntese será descrita posteriormente) a partir de sulfatos do ambiente; a via é mostrada no lado direito da Figura 22-15. O sulfato é ativado em duas etapas, produzindo 3'-fosfoadenosina-5'-fosfossulfato (PAPS), que sofre redução a sulfeto, usando oito elétrons. O sulfeto é, então, utilizado para a formação de cisteína a partir de serina, em uma via de dois passos. Os mamíferos sintetizam cisteína a partir de dois aminoácidos: a metionina fornece o átomo de enxofre e a serina fornece o esqueleto carbonado. A metionina é inicialmente convertida em

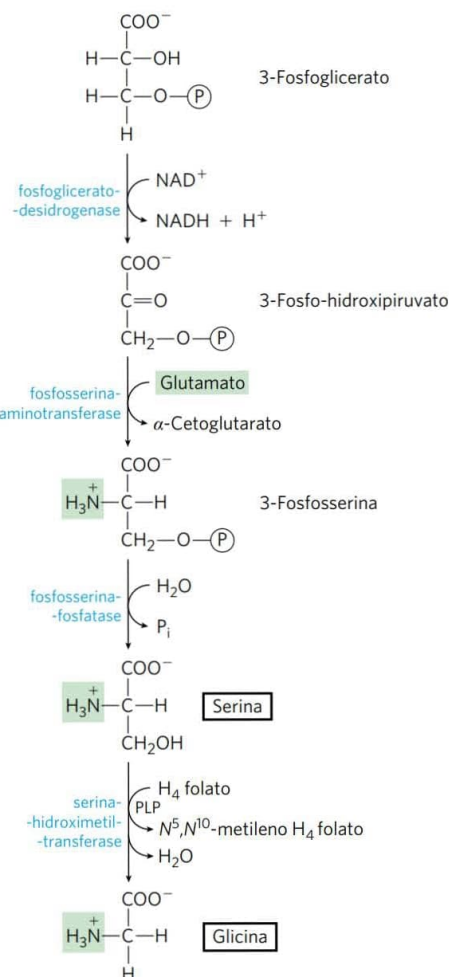


FIGURA 22-14 Biossíntese de serina a partir de 3-fosfoglicerato e biossíntese de glicina a partir de serina, em todos os organismos. A glicina também pode ser sintetizada a partir de CO_2 e NH_4^+ pela ação da glicina-sintase, com N^5, N^{10} -metilenotetra-hidrofolato como doador de grupo metila (ver texto).

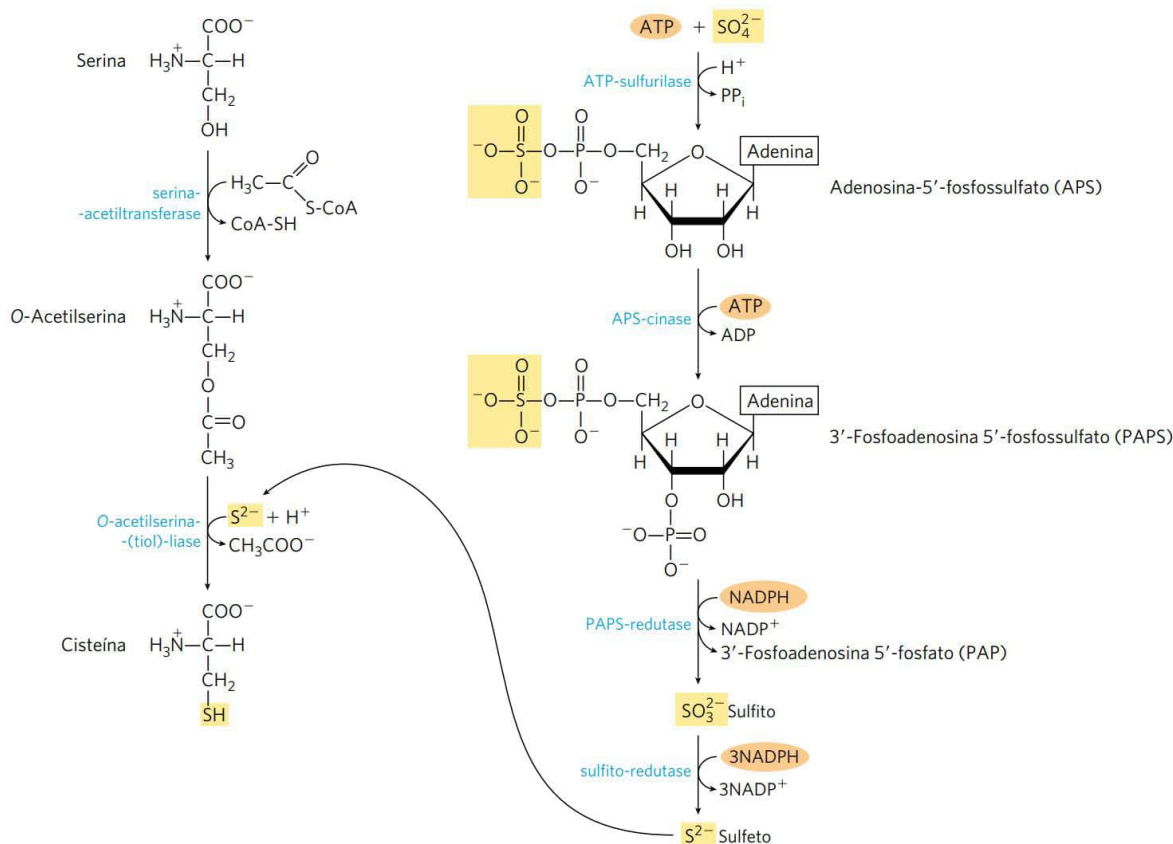


FIGURA 22-15 Biossíntese de cisteína a partir de serina em bactérias e plantas. A origem do enxofre reduzido é mostrada na via à direita.

Três aminoácidos não essenciais e seis aminoácidos essenciais são sintetizados a partir de oxalacetato e piruvato

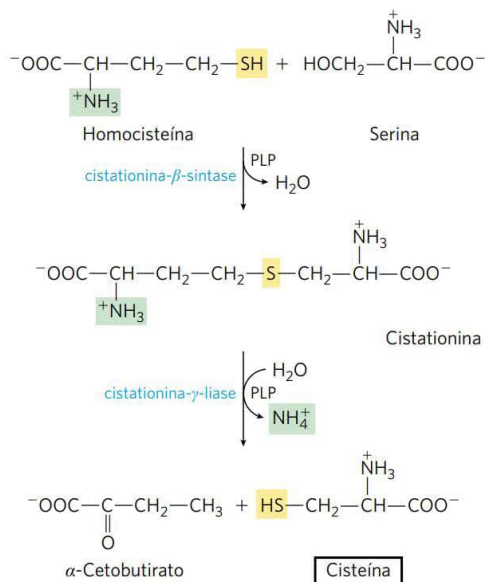
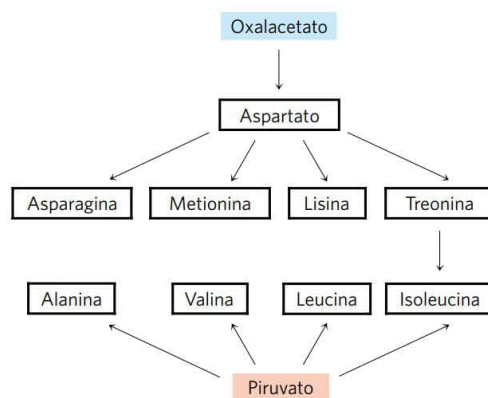


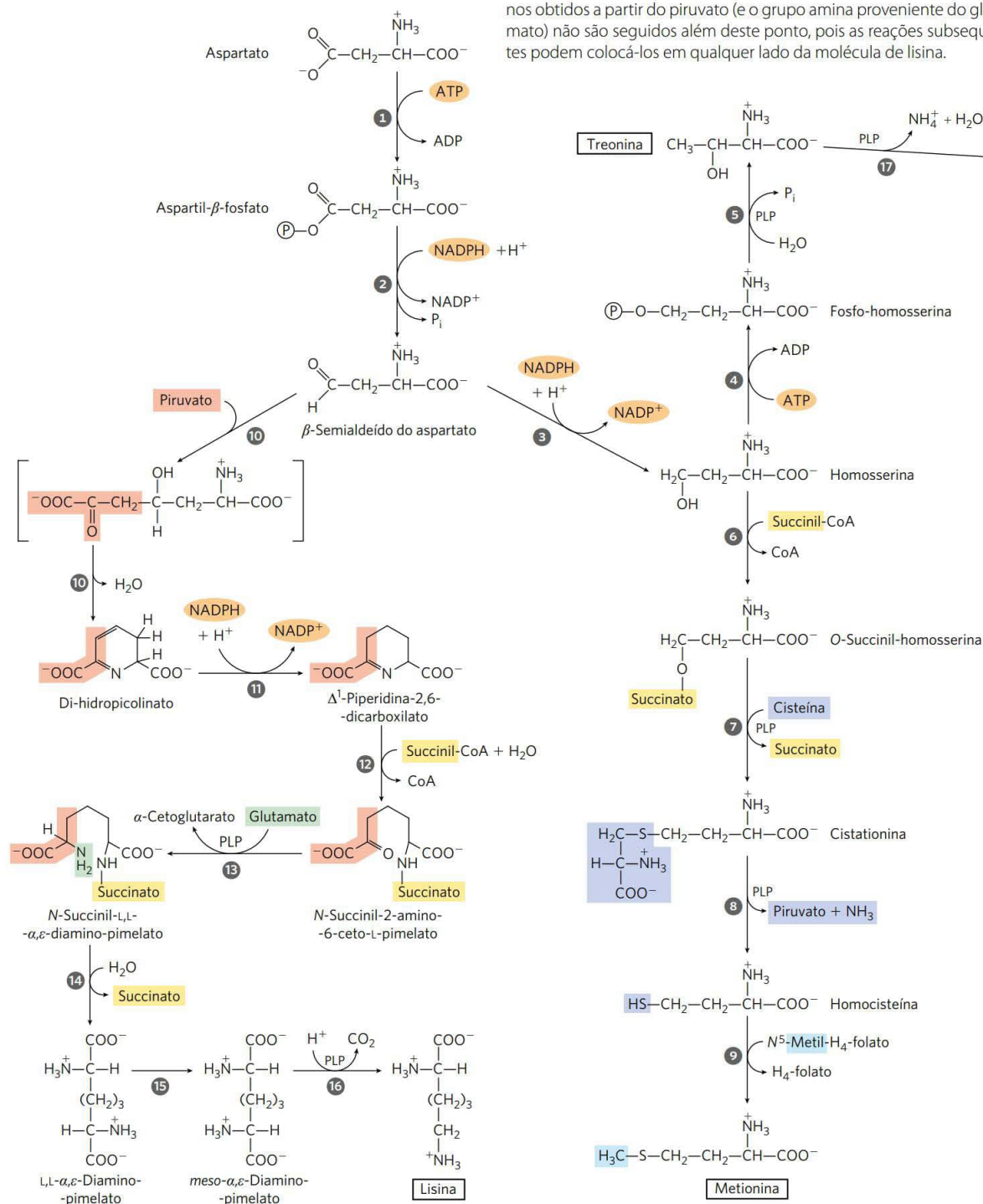
FIGURA 22-16 Biossíntese de cisteína a partir de homocisteína e serina em mamíferos. A homocisteína é formada a partir da metionina, como descrito no texto.



Alanina e **aspartato** são sintetizados a partir de piruvato e oxalacetato, respectivamente, por transaminação com o glutamato. A **asparagina** é sintetizada por amidação do aspartato, com o NH_4^+ sendo doado pela glutamina. Esses são aminoácidos não essenciais e suas vias biossintéticas bastante simples ocorrem em todos os organismos.



Por razões não compreendidas completamente, linfócitos malignos, presentes na leucemia linfoblástica aguda (LLA) da infância, utilizam asparagina sérica para



seu crescimento. A quimioterapia para essa doença é administrada juntamente com uma L-asparaginase, obtida de bactérias, de modo que a enzima funciona reduzindo a asparagina do soro. Os tratamentos combinados resultam em

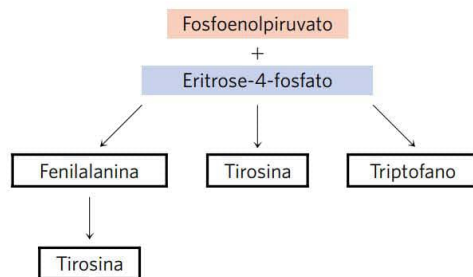
uma taxa de remissão maior que 95% nos casos de LLA da infância (o tratamento apenas com L-asparaginase produz remissão em 40 a 60% dos casos). No entanto, o tratamento com asparaginase tem alguns efeitos colaterais deletérios, e



Metionina, treonina, lisina, isoleucina, valina e leucina são aminoácidos essenciais; seres humanos não são capazes de sintetizá-los. Suas vias biossintéticas em bactérias são complexas e interligadas (**Figura 22-17**). Em alguns casos, as vias em bactérias, fungos e plantas diferem significativamente.

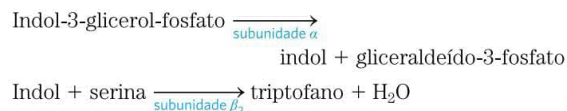
O aspartato origina **metionina**, **treonina** e **lisina**. Os pontos de ramificação dessas vias ocorrem a partir do β -semialdeído do aspartato, um intermediário em todas as três vias, e a partir da homoserina, um precursor da treonina e da metionina. A treonina, por sua vez, é um dos precursores da isoleucina. As vias da **valina** e da **isoleucina** compartilham quatro enzimas (Figura 22-17, etapas 18 a 21). O piruvato origina valina e isoleucina por meio de vias que iniciam com a condensação de dois carbonos do piruvato (na forma de hidroxietil-tiamina-pirofosfato; ver Figura 14-15b) com outra molécula de piruvato (na via da valina) ou com α -cetobutirato (na via da isoleucina). O α -cetobutirato é derivado da treonina, em uma reação que requer piridoxal-fosfato (Figura 22-17, etapa 17). Um intermediário na via da valina, o α -cetoisovalerato, é o ponto de partida para uma ramificação da via, contendo quatro passos, que leva à **leucina** (etapas 22 a 25).

O corismato é um intermediário-chave na síntese de triptofano, fenilalanina e tirosina



Anéis aromáticos não estão facilmente disponíveis no ambiente, apesar de o anel benzênico ser muito estável. A via com ramificações levando ao triptofano, à fenilalanina e à tirosina, que ocorre em bactérias, fungos e plantas, é a principal via biológica para a formação do anel aromático. Ela ocorre pelo fechamento do anel a partir de um precursor alifático, seguindo-se a adição, passo a passo, das ligações duplas. Os quatro primeiros passos produzem chiquimato, uma molécula de sete carbonos derivada da eritrose-4-fosfato e do fosfoenolpiruvato (Figura 22-18). O chiquimato é convertido em corismato por meio de três passos, que incluem a adição de mais três carbonos a partir de outra molécula de fosfoenolpiruvato. O corismato é o primeiro ponto de ramificação da via, com uma ramificação levando ao triptofano e outra à fenilalanina e à tirosina.

Na ramificação que produz **triptofano** (Figura 22-19), o corismato é convertido em antranilato, em uma reação em que a glutamina doa o nitrogênio que se tornará parte do anel indólico. O antranilato, então, condensa-se com o PRPP. O anel indólico do triptofano é derivado dos carbonos do anel e do grupo amino do antranilato, mais dois carbonos oriundos do PRPP. A reação final da sequência é catalisada pela **triptofano-sintase**. Essa enzima apresenta estrutura com quatro subunidades $\alpha_2\beta_2$ e pode dissociar-se em duas subunidades α e uma subunidade β_2 , as quais catalisam partes diferentes da reação global:

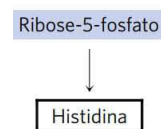


A segunda parte da reação requer piridoxal-fosfato (Figura 22-20). O indol formado na primeira parte não é liberado pela enzima. Em vez disso, move-se através de um canal, desde o sítio ativo da subunidade α até o sítio ativo de uma das subunidades β , onde se condensa com uma base de Schiff, um intermediário formado a partir de serina e PLP. Esse tipo de canalização de intermediários pode ser uma característica de toda a via, do corismato ao triptofano. Sítios ativos enzimáticos que catalisam os diferentes passos (algumas vezes não são passos sequenciais) da via até o triptofano são encontrados em polipeptídeos únicos em algumas espécies de fungos e bactérias, porém estão em proteínas separadas em outras espécies. Além disso, a atividade de algumas dessas enzimas requer uma associação não covalente com outras enzimas da via. Essas observações sugerem que todas as enzimas da via são componentes de um grande complexo multienzimático, tanto em bactérias quanto em eucariotos. Esses complexos geralmente não são preservados intactos quando as enzimas são isoladas utilizando métodos bioquímicos tradicionais, mas há grandes evidências da existência de complexos multienzimáticos para essa e outras vias metabólicas (ver Seção 16.3).

Em plantas e bactérias, a **fenilalanina** e a **tirosina** são sintetizadas a partir do corismato em vias muito menos complexas que a via do triptofano. O intermediário comum é o prefenato (Figura 22-21). O passo final em ambos os casos é a transaminação com o glutamato.

Os animais podem produzir tirosina diretamente a partir da fenilalanina, pela hidroxilação no C-4 do grupo fenila pela **fenilalanina-hidroxilase**; essa enzima também participa da degradação da fenilalanina (ver Figuras 18-23 e 18-24). A tirosina é considerada um aminoácido condicionalmente essencial, ou não essencial, à medida que pode ser sintetizada a partir do aminoácido essencial fenilalanina.

A biossíntese de histidina utiliza precursores da biossíntese de purinas



A via para a síntese de **histidina** em todas as plantas e bactérias difere em diversos aspectos das vias biossintéticas de outros aminoácidos. A histidina é derivada de três precursores (Figura 22-22): o PRPP contribui com cinco carbonos, o anel púrico do ATP contribui com um nitrogênio e um carbono e a glutamina fornece o segundo nitrogênio do anel. Os passos-chave são a condensação do ATP e do PRPP, em que o N-1 do anel púrico liga-se ao C-1 ativado da ribose do PRPP (etapa 1 na Figura 22-22); a abertura

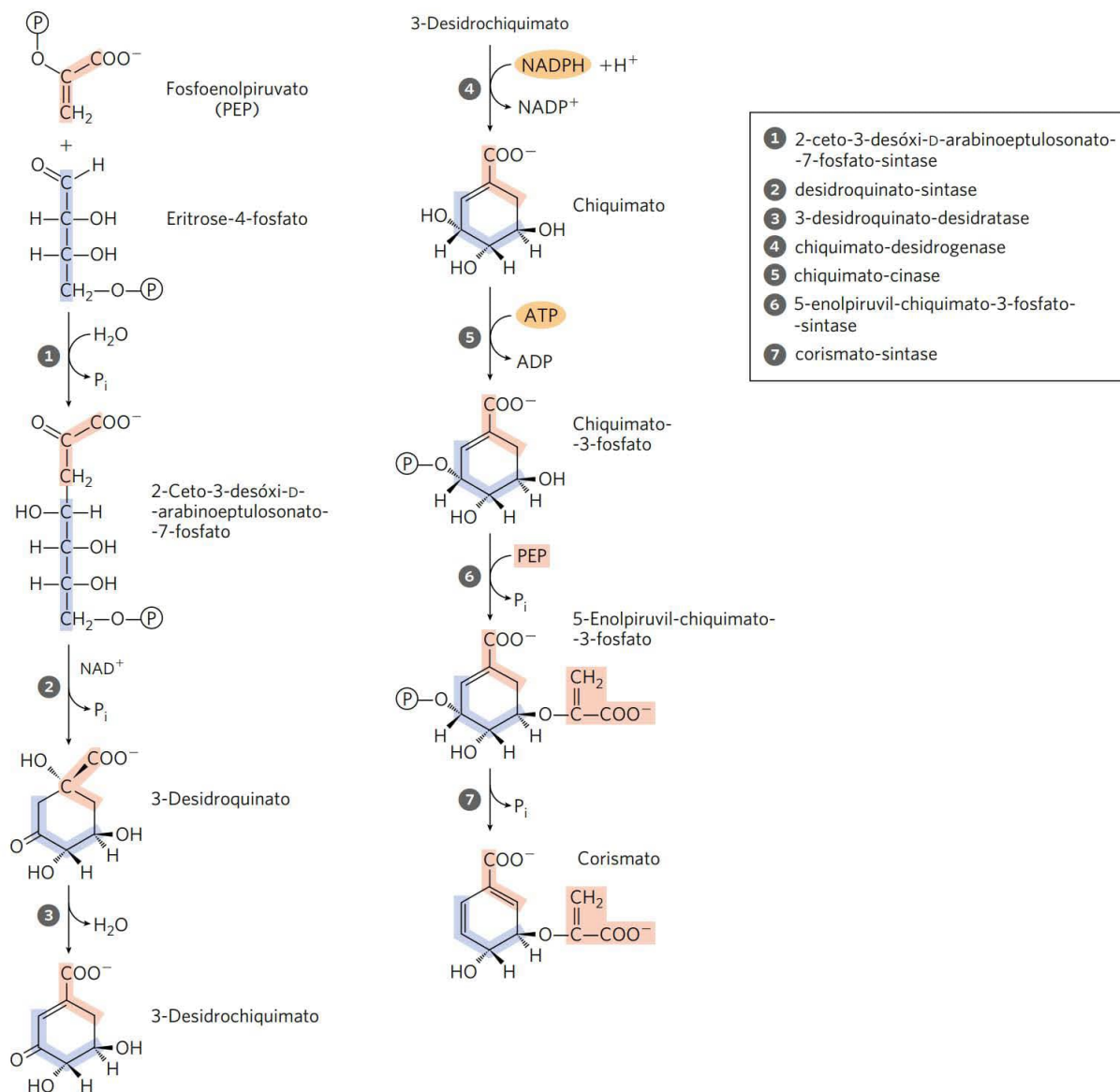


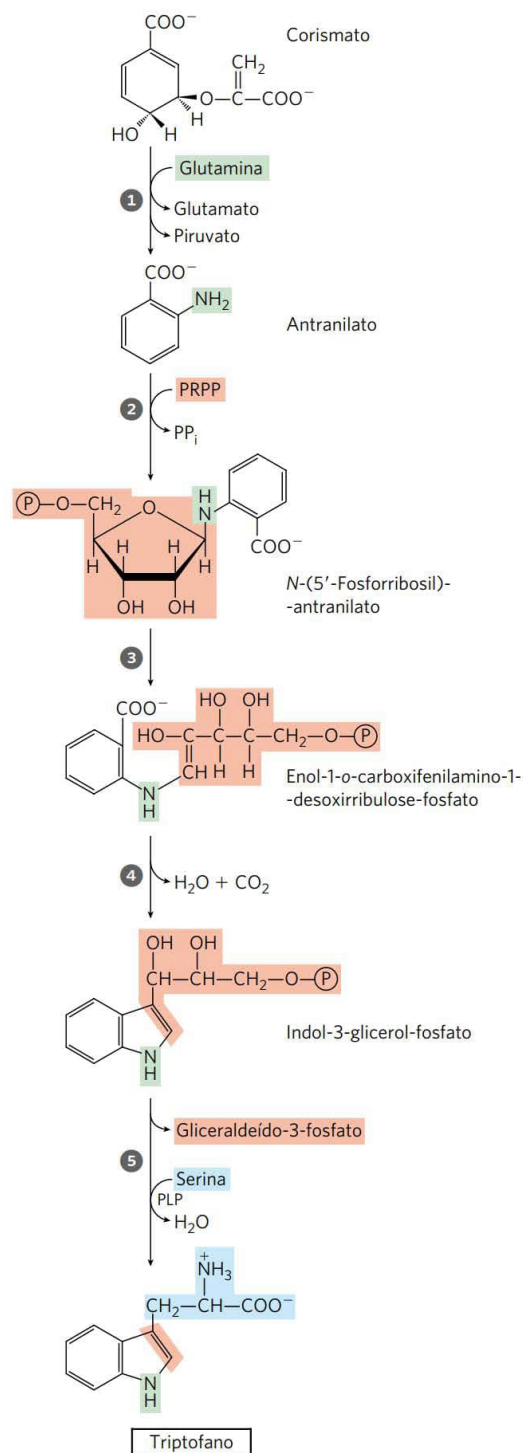
FIGURA 22-18 Biossíntese de corismato, intermediário na síntese de aminoácidos aromáticos em bactérias e plantas. Todos os carbonos são derivados da eritrose-4-fosfato (em lilás) ou do fosfoenolpiruvato (em cor salmão). Observe que o NAD^+ , necessário como cofator na etapa 2, é liberado sem modificações; ele pode ser transitoriamente reduzido a NADH durante a reação, com a formação de um intermediário de reação oxidado. A etapa 6 é inibida competitivamente por glifosato ($^-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{PO}_3^{2-}$), o ingrediente ativo do Roundup, um herbicida amplamente utilizado. Esse herbicida é relativamente atóxico para mamíferos, que não apresentam essa via biossintética. Os intermediários quinato e chiquimato foram assim denominados devido ao nome das plantas em que foram encontrados acúmulos desses intermediários.

do anel púrico que, ao final, deixa o N-1 e o C-2 da adenina ligados à ribose (etapa 3); e a formação do anel imidazol, uma reação na qual a glutamina doa um nitrogênio (etapa 5). A utilização do ATP como um metabólito, em vez de um cofator rico em energia, é incomum – mas não é um desperdício, uma vez que se encaixa com a via biossintética da purina. A estrutura remanescente da molécula do ATP, liberada após a transferência do N-1 e do C-2, é o 5-aminoimidazol-4-carboxamida-ribonucleotídeo (AICAR),

um intermediário da biossíntese de purinas (ver Figura 22-35), que é rapidamente reciclado até ATP.

A biossíntese de aminoácidos está sob regulação alostérica

Como foi detalhado no Capítulo 15, o controle do fluxo por uma via metabólica frequentemente reflete as atividades de múltiplas enzimas daquela via. No caso da síntese de ami-



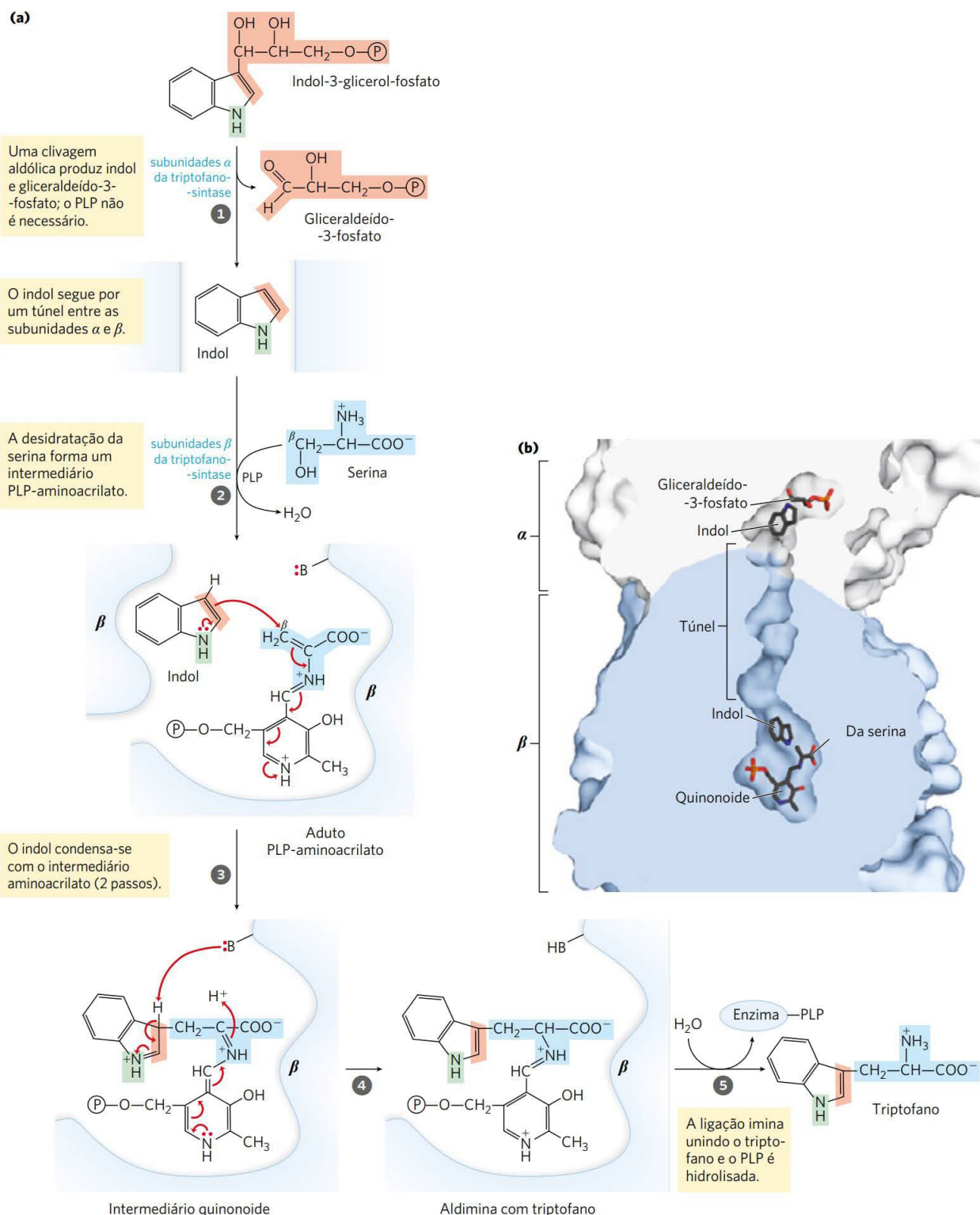
- 1 antranilato-sintase
- 2 antranilato-fosforribosil-transferase
- 3 N-(5'-fosforribosil)-antranilato-isomerase
- 4 indol-3-glicerol-fosfato-sintase
- 5 triptofano-sintase

noácidos, a regulação ocorre em parte por meio de inibição por retroalimentação da primeira reação, pelo produto final da via. Em geral, essa primeira reação é catalisada por uma enzima alostérica, que desempenha um papel importante no controle geral do fluxo através da via em questão. Por exemplo, a **Figura 22-23** mostra a regulação alostérica da síntese de isoleucina a partir de treonina (detalhada na Figura 22-17). O produto final, a isoleucina, é um inibidor alostérico da primeira reação da sequência. Em bactérias, esta modulação alostérica da síntese dos aminoácidos contribui para o ajuste, minuto a minuto, da atividade da via às necessidades da célula.

A regulação alostérica de uma enzima individual pode ser consideravelmente mais complexa. Um exemplo é o notável conjunto de controles alostéricos exercidos sobre a glutamina-sintetase de *E. coli* (Figura 22-8). Seis produtos derivados da glutamina atuam como moduladores na retroalimentação negativa da enzima, e os efeitos gerais desses e de outros moduladores são mais que aditivos. Essa regulação é denominada **inibição orquestrada**.

Mecanismos adicionais contribuem para a regulação das vias biossintéticas dos aminoácidos. Uma vez que os 20 aminoácidos comuns devem ser produzidos nas proporções adequadas para a síntese proteica, as células desenvolveram formas não apenas de controlar as velocidades de síntese de aminoácidos individuais, mas também de produzi-los de modo coordenado. Essa coordenação é especialmente bem desenvolvida em células bacterianas de crescimento rápido. A **Figura 22-24** mostra como as células de *E. coli* coordenam a síntese de lisina, metionina, treonina e isoleucina, aminoácidos produzidos todos a partir do aspartato. Vários tipos importantes de padrões inibidores são evidenciados. A etapa desde o aspartato até aspartil-β-fosfato é catalisada por três isoenzimas, cada uma delas controlada independentemente por diferentes moduladores. Esta **multiplicidade enzimática** impede que um produto final da biossíntese inative completamente etapas-chave em uma via, quando outros produtos da mesma via são necessários. Os passos desde o β-semialdeído do aspartato até a homoserina e da treonina até o α-cetobutirato (detalhados na Figura 22-17) também são catalisados por isoenzimas duplas, independentemente controladas. Uma isoenzima para a conversão de aspartato em aspartil-β-fosfato é inibida alostericamente por dois moduladores diferentes, lisina e isoleucina, cujas ações são mais que aditivas – outro exemplo de inibição concertada. A sequência desde o aspartato até a isoleucina está sujeita a inibições por retroalimentação múltiplas e sobrepostas; por exemplo, a isoleucina inibe a conversão de treonina em α-cetobutirato (como descrito anteriormente), e a treonina inibe sua própria formação em três pontos: a partir da homoserina, a partir do β-semialdeído do aspartato e a partir do aspartato (etapas 4, 3 e 1 na Figura 22-17). Esse mecanismo regulador global é denominado **inibição sequencial por retroalimentação**.

FIGURA 22-19 Biossíntese de triptofano a partir de corismato em bactérias e plantas. Na *E. coli*, as enzimas que catalisam as etapas 1 e 2 são subunidades de um complexo único.



MECANISMO-FIGURA 22-20 Reação da triptofano-sintase. (a) Esta enzima catalisa uma reação envolvendo múltiplos passos e diversos tipos de rearranjos químicos. As transformações facilitadas pelo PLP ocorrem no carbono β (C-3) do aminoácido, ao contrário das reações descritas na Figura 18-6, que ocorrem no carbono α . O carbono β da serina é ligado ao sistema indólico de anéis. (b) O indol gerado na subunidade α (em branco) move-se através de um túnel para a subunidade β (em azul), onde se condensa com a porção serina. [Fonte: (b) PDB ID 1KFJ, V. Kulik et al., *J. Mol. Biol.* 324:677, 2002.]

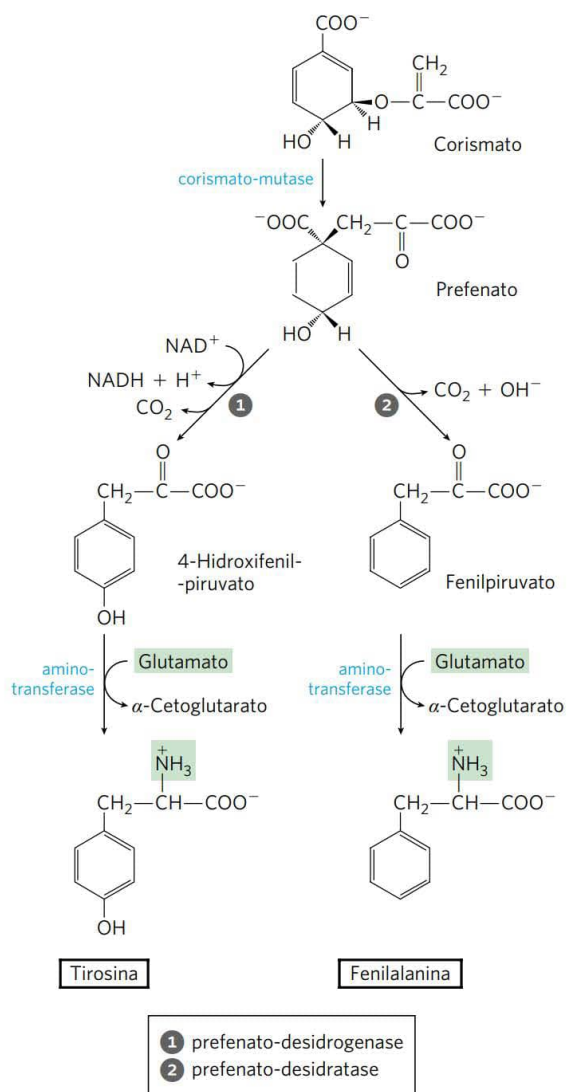


FIGURA 22-21 Biossíntese de fenilalanina e tirosina a partir de corismato em bactérias e plantas. A conversão do corismato em prefenato é um exemplo biológico raro de um rearranjo de Claisen.

Padrões semelhantes são evidenciados nas vias que levam aos aminoácidos aromáticos. O primeiro passo da via inicial até a formação do intermediário comum corismato é catalisado pela enzima 2-ceto-3-desóxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato (DAHP)-sintase (etapa 1 na Figura 22-18). Muitos microrganismos e plantas têm três isoenzimas para a DAHP-sintase. Uma é inibida alostericamente (inibição por retroalimentação) por fenilalanina, outra por tirosina e a terceira por triptofano. Esse esquema ajuda a via geral a responder às necessidades celulares para um ou mais dos aminoácidos aromáticos. Regulação adicional ocorre após a via ramificar-se, no corismato. Por exemplo, as enzimas que catalisam os dois primeiros passos da ramificação que leva ao triptofano estão sujeitas à inibição alostérica pelo triptofano.

RESUMO 22.2 Biossíntese de aminoácidos

- Plantas e bactérias sintetizam todos os 20 aminoácidos comuns. Os mamíferos podem sintetizar cerca de metade deles, os demais devem estar presentes na dieta (aminoácidos essenciais).
- Entre os aminoácidos não essenciais, o glutamato é formado por aminação redutora do α -cetoglutarato e serve como precursor de glutamina, prolina e arginina. Alanina e aspartato (e assim também a asparagina) são formados a partir do piruvato e do oxalacetato, respectivamente, por transaminação. A cadeia carbonada da serina é derivada do 3-fosfoglicerato. A serina é precursora da glicina; o átomo de carbono β da serina é transferido para o tetra-hidrofolato. Em microrganismos, a cisteína é produzida a partir de serina e de sulfeto, produzido pela redução de sulfato obtido do ambiente. Os mamíferos produzem cisteína a partir de metionina e serina, por uma série de reações que requer *S*-adenosilmetionina e cistationina.
- Entre os aminoácidos essenciais, os aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano) são produzidos por uma via em que o corismato representa um ponto-chave de ramificação. O fosforribosil-pirofosfato é o precursor do triptofano e da histidina. A via da histidina está interconectada com a via de síntese de purinas. A tirosina também pode ser produzida por hidroxilação da fenilalanina (e, por isso, é considerada um aminoácido condicionalmente essencial). As vias para os demais aminoácidos essenciais são complexas.
- As vias de biossíntese de aminoácidos estão sujeitas à inibição alostérica pelo produto final; a enzima reguladora geralmente é a primeira da sequência. A regulação das várias vias sintéticas é coordenada.

22.3 Moléculas derivadas de aminoácidos

Além de seu papel como blocos constitutivos das proteínas, os aminoácidos são precursores de muitas biomoléculas especializadas, incluindo hormônios, coenzimas, nucleotídeos, alcaloides, polímeros constituintes da parede celular, porfirinas, antibióticos, pigmentos e neurotransmissores. Aqui, serão descritas as vias de síntese de diversos desses derivados de aminoácidos.

A glicina é precursora das porfirinas

A biossíntese de **porfirinas**, para as quais a glicina é um importante precursor, é nosso primeiro exemplo, devido à importância central do núcleo das porfirinas nas hemoproteínas, como a hemoglobina e os citocromos.

As porfirinas são sintetizadas a partir de quatro moléculas do derivado monopirrólico **porfobilinogênio**, o qual é derivado de duas moléculas de δ -aminolevulinato. Existem duas vias principais para o δ -aminolevulinato. Em eucariotos superiores (**Figura 22-25a**), a glicina reage com succinil-CoA na primeira etapa da via, produzindo α -amino- β -cetoadipato, o qual é, então, descarboxilado a δ -aminolevulinato. Em plantas, algas e na maioria das bactérias, δ -aminolevulinato é sintetizado a

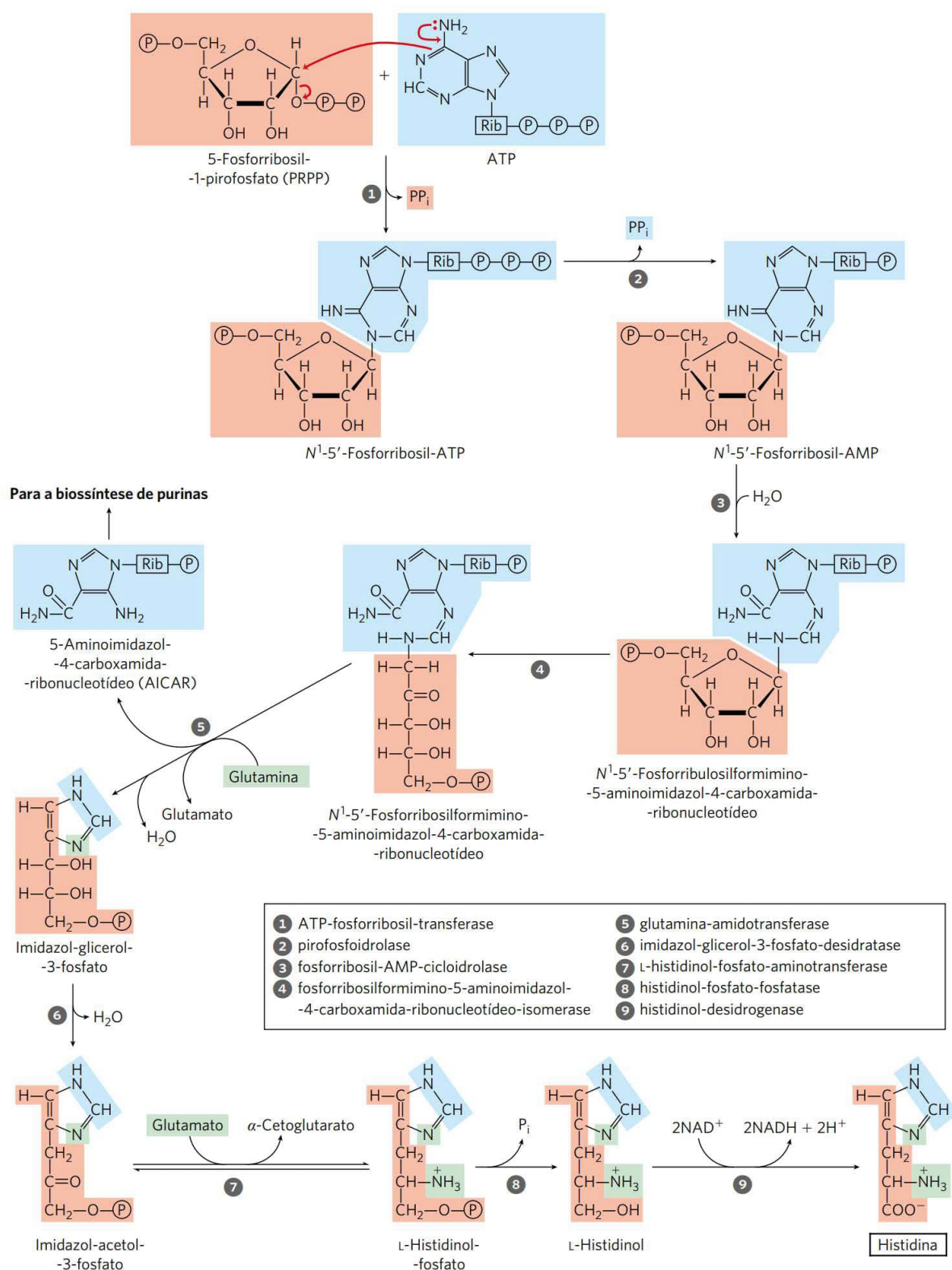


FIGURA 22-22 Biossíntese de histidina em bactérias e plantas. Átomos originários do PRPP e do ATP estão sombreados em cor salmão e azul, respectivamente. Dois nitrogênios da histidina provêm da glutamina e do glutamato (em verde). Observe que o derivado do ATP que resta após a etapa 5 (AICAR) é um intermediário da biossíntese de purinas (ver Figura 22-35, etapa 9), de modo que o ATP é rapidamente regenerado.

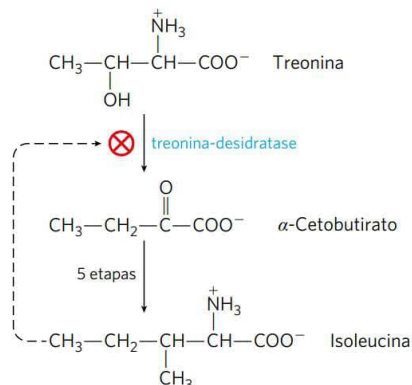


FIGURA 22-23 Regulação alostérica da biossíntese de isoleucina.

A primeira reação da via desde a treonina até a isoleucina é inibida pelo produto final, a isoleucina. Esse foi um dos primeiros exemplos descobertos de inibição alostérica por retroalimentação. As etapas desde o α -cetobutirato até a isoleucina correspondem às etapas 18 a 21 na Figura 22-17 (totalizam do cinco etapas, porque a 19 é uma reação de duas etapas).

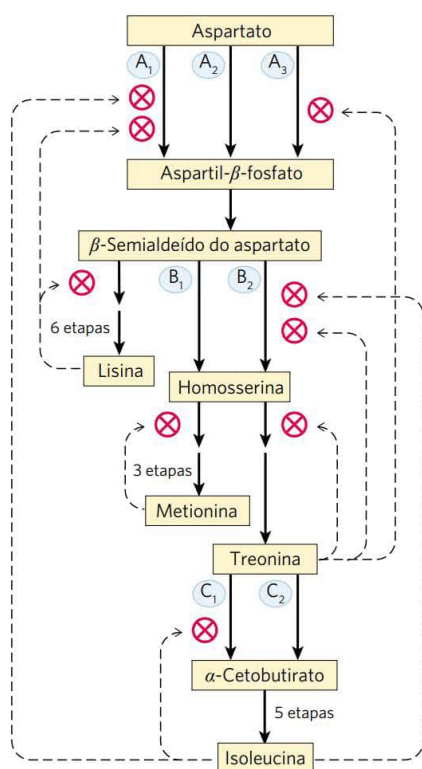


FIGURA 22-24 Mecanismos reguladores interconectados na biossíntese de diversos aminoácidos derivados do aspartato em *E. coli*.

Três enzimas (A, B e C) têm duas ou três isoformas, indicadas pelos subscritos numéricos. Em cada caso, uma isoforma (A_2 , B_1 e C_2) não apresenta regulação alostérica; essas isoenzimas são reguladas por mudanças na quantidade de enzima sintetizada (Capítulo 28). A síntese das isoenzimas A_2 e B_1 é reprimida quando os níveis de metionina são altos, e a síntese da isoenzima C_2 é reprimida quando os níveis de isoleucina são altos. A enzima A é a aspartato-cinase, a enzima B é a homoserina-desidrogenase e a enzima C é a treonina-desidratase.

partir de glutamato (Figura 22-25b). O glutamato é inicialmente esterificado, originando glutamyl-tRNA^{Glu} (ver, no Capítulo 27, o tópico referente ao RNA transportador); a redução pelo NADPH converte o glutamato em 1-semialdeído do glutamato, o qual é clivado do tRNA. Uma aminotransferase converte o 1-semialdeído do glutamato em δ -aminolevulinato.

Em todos os organismos, duas moléculas de δ -aminolevulinato condensam-se para formar porfobilinogênio e, por meio de uma série de reações enzimáticas complexas, quatro moléculas de porfobilinogênio unem-se, formando **protoporfirina** (Figura 22-26). O átomo de ferro é incorporado após a protoporfirina ter sido formada, em um passo catalisado pela ferroquelatase. A biossíntese de porfirinas é regulada nos eucariotos superiores pela concentração do produto heme, o qual serve como inibidor por retroalimentação dos passos iniciais da via de síntese. Defeitos genéticos na biossíntese de porfirinas podem levar ao acúmulo de intermediários da via, causando várias doenças humanas, conhecidas coletivamente como **porfírias** (Quadro 22-2).

A degradação do heme tem múltiplas funções



O grupo ferro-porfirina (heme) da hemoglobina, liberado no baço a partir de eritrócitos em degeneração, é degradado, produzindo Fe^{2+} livre e, por fim, **bilirrubina**. A via também contribui para o pigmento presente nas misturas dos sais biliares derivados do colesterol (ver Figura 21-38).

O primeiro passo nessa via de duas etapas é catalisado pela heme-oxigenase, que converte heme em biliverdina, derivado tetrapirrólico linear (aberto) (Figura 22-27). Os demais produtos da reação são Fe^{2+} livre e CO. O Fe^{2+} é rapidamente ligado à ferritina. O monóxido de carbono é um tóxico que se liga à hemoglobina (ver Quadro 5-1), e a produção de CO pela heme-oxigenase assegura que, mesmo na ausência de exposição ambiental, cerca de 1% do heme de uma pessoa esteja complexado ao CO.

A biliverdina é convertida em bilirrubina no segundo passo, catalisado pela biliverdina-redutase. Você pode monitorar essa reação colorimetricamente em um experimento *in situ* bastante familiar. Quando você sofre um machucado que resulta em hematoma, a cor negra e/ou púrpura resulta da hemoglobina liberada pelos eritrócitos danificados. Com o tempo, a cor muda para o verde da biliverdina e, após, para o amarelo da bilirrubina. A bilirrubina é bastante insolúvel, sendo transportada na corrente sanguínea complexada com a albumina sérica. No fígado, a bilirrubina é transformada no pigmento da bile, bilirrubina-diglicuronato. Esse produto é suficientemente hidrossolúvel para ser secretado com outros componentes da bile para o intestino delgado, onde enzimas microbianas o convertem em diversos produtos, predominantemente urobilinogênio. Algum urobilinogênio é absorvido e chega ao sangue, sendo transportado até os rins, onde é convertido em urobilina, o componente que confere à urina sua coloração amarela (Figura 22-27). O urobilinogênio que permanece no intestino é convertido (em outra reação

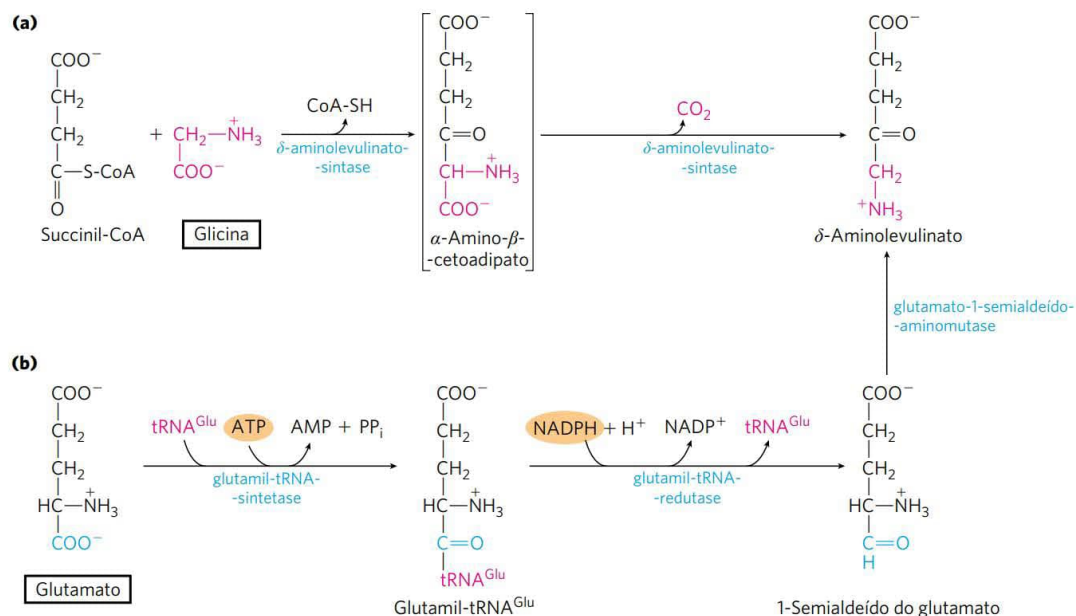


FIGURA 22-25 Biossíntese de δ -aminolevulinato. (a) Na maioria dos animais, incluindo os mamíferos, o δ -aminolevulinato é sintetizado a partir de glicina e succinil-CoA. Os átomos fornecidos pela glicina estão mostrados em cor-de-rosa. (b) Em bactérias e plantas, o precursor do δ -aminolevulinato é o glutamato.

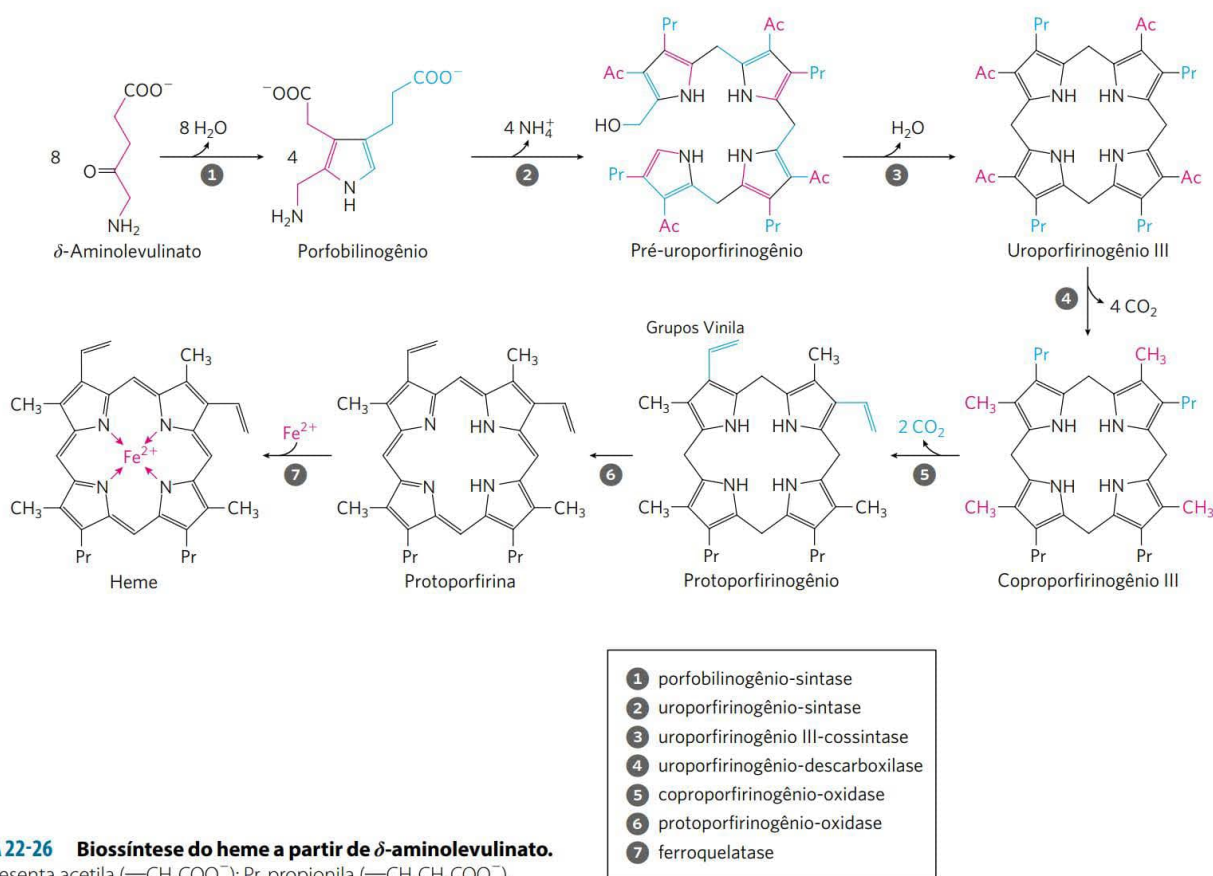


FIGURA 22-26 Biossíntese do heme a partir de δ -aminolevulinato. Ac representa acetila ($-\text{CH}_2\text{COO}^-$); Pr, propionila ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$).

QUADRO 22-2



MEDICINA

Sobre reis e vampiros

As porfrias são um grupo de doenças genéticas que resultam de defeitos em enzimas da via biossintética da glicina às porfirinas; precursores específicos de porfirinas acumulam-se nos eritrócitos, nos fluidos corporais e no fígado. A forma mais comum é a porfria intermitente aguda. A maioria das pessoas que herdam essa condição é heterozigota e, em geral, assintomática, pois a única cópia normal do gene fornece um nível suficiente de função enzimática. Contudo, certos fatores nutricionais ou ambientais (ainda não completamente esclarecidos) podem levar a um aumento de δ -aminolevulinato e porfobilinogênio, levando a crises de dor abdominal aguda e disfunção neurológica. O rei George III, monarca britânico durante a Guerra de Independência dos Estados Unidos, sofria de graves episódios de aparente loucura, que embaçaram o registro histórico desse homem talentoso. Os sintomas de sua condição sugerem que George III sofria de porfria intermitente aguda.

Uma das mais raras porfrias resulta de um acúmulo de uroporfirinogênio I, isômero anormal de um precursor da protoporfirina. Esse composto cora a urina de vermelho, faz os dentes fluorescerem fortemente sob luz ultravioleta e torna a pele anormalmente sensível à luz do sol. Muitas pessoas com essa porfria são anêmicas, pois é sintetizada uma quantidade insuficiente de heme. Essa

condição genética pode ter originado os mitos dos vampiros nas lendas folclóricas.

Os sintomas da maioria das porfrias atualmente são controlados com facilidade com a manipulação da dieta ou com a administração de heme ou de derivados do heme.



dependente dos microrganismos da microbiota intestinal) em estercobilina (Figura 22-27), que confere às fezes a cor marrom-avermelhada.

Insuficiência da função hepática ou bloqueio da secreção de bile determina o extravasamento da bilirrubina do fígado para o sangue, resultando em coloração amarela da pele e da esclera dos olhos, condição denominada icterícia. Em casos de icterícia, a determinação da concentração de bilirrubina no sangue pode ser útil para o diagnóstico da doença hepática subjacente. Bebês recém-nascidos algumas vezes desenvolvem icterícia por ainda não produzirem quantidades suficientes de glicuronil-bilirrubina-transferase para processar sua bilirrubina. Um tratamento tradicional para reduzir o excesso de bilirrubina consiste na exposição a uma lâmpada fluorescente, que leva à conversão fotoquímica da bilirrubina em compostos mais solúveis e, portanto, mais facilmente excretáveis.

Essas vias da degradação do heme desempenham papéis significativos na proteção das células contra dano oxidativo e na regulação de certas funções celulares. O CO produzido pela heme-oxigenase é tóxico em altas concentrações; contudo, em concentrações muito baixas, como aquelas resultantes da degradação do heme, esse composto parece ter algumas funções reguladoras e/ou de sinalização. O CO atua como vasodilatador, de modo semelhante ao óxido nítrico (discutido a seguir), embora com menor potência. Baixos níveis de CO também têm alguns efeitos reguladores sobre a neurotransmissão. A bilirrubina é o antioxidante mais abundante nos tecidos dos mamíferos, sendo responsável pela maior parte da atividade antioxi-

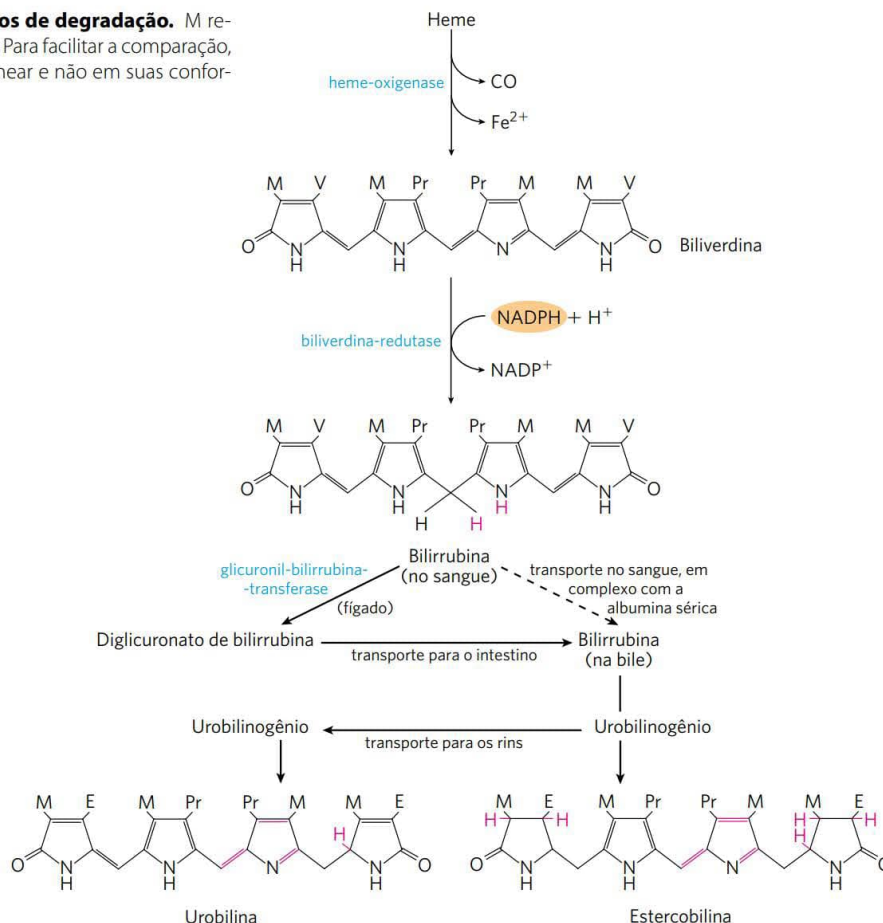
dante no soro. Seus efeitos protetores parecem ser especialmente importantes para o cérebro em desenvolvimento dos bebês recém-nascidos. A toxicidade celular associada à icterícia pode ser devida ao fato de os níveis de bilirrubina excederem os níveis de albumina sérica necessários para solubilizar esse composto.

Considerando esses vários papéis para os produtos da degradação do heme, a via de degradação está sujeita à regulação, principalmente em seu primeiro passo. Os seres humanos possuem pelo menos três isoenzimas da heme-oxigenase (HO). A HO-1 é altamente regulada; a expressão de seu gene é induzida por uma ampla gama de condições relacionadas ao estresse (estresse hemodinâmico, angiogênese [desenvolvimento descontrolado de vasos sanguíneos], hipóxia, hiperoxia, choque térmico, exposição à radiação ultravioleta, peróxido de hidrogênio e muitos outros ataques metabólicos). A HO-2 é encontrada principalmente no encéfalo e nos testículos, onde é expressa constitutivamente. A terceira isoenzima, HO-3, não é ativa cataliticamente, mas pode desempenhar um papel na detecção de oxigênio. ■

Os aminoácidos são precursores da creatina e da glutatona

A **fosfocreatina**, derivada da **creatina**, é um importante tampão energético no músculo esquelético (ver Quadro 23-2). A creatina é sintetizada a partir da glicina e da arginina (Figura 22-28); a metionina, na forma de *S*-adenosilmetionina, atua como doadora do grupo metila.

FIGURA 22-27 Bilirrubina e seus produtos de degradação. M representa metila; V, vinila; Pr, propionila; E, etila. Para facilitar a comparação, estas estruturas estão mostradas na forma linear e não em suas conformações estereoquímicas corretas.



A **glutathiona (GSH)**, presente em plantas, animais e algumas bactérias, frequentemente em níveis elevados, pode ser considerada como um tampão *redox*. É derivada do glutamato, da cisteína e da glicina (**Figura 22-29**). O grupo γ -carboxila do glutamato é ativado pelo ATP, formando um intermediário acil-fosfato, que é, então, atacado pelo grupo α -amina da cisteína. Uma segunda reação de condensação se segue, com o grupo α -carboxila da cisteína ativado na forma de acil-fosfato, permitindo a reação com a glicina. A forma oxidada da glutathiona (GSSG), produzida no curso de suas atividades *redox*, contém duas moléculas de glutathiona ligadas por meio de uma ligação dissulfeto.

A glutathiona provavelmente ajuda a manter os grupos sulfidril das proteínas no estado reduzido e o ferro do heme no estado ferroso (Fe^{2+}), servindo como agente redutor para a glutarredoxina na síntese de desoxirribonucleotídeos (ver Figura 22-41). Sua função *redox* também é utilizada para remover peróxidos tóxicos formados durante o curso normal do crescimento e do metabolismo em condições aeróbicas:

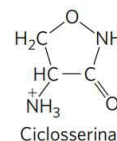
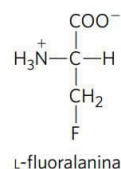


Essa reação é catalisada pela **glutathiona-peroxidase**, enzima notável pelo fato de conter um átomo de selênio (Se) covalentemente ligado, na forma de selênio-cisteína (ver Figura 3-8a), essencial para sua atividade.

D-Aminoácidos são encontrados basicamente em bactérias



Embora D-aminoácidos geralmente não ocorram em proteínas, eles têm algumas funções especiais na estrutura das paredes celulares bacterianas e em antibióticos peptídicos. Os peptidoglicanos bacterianos (ver Figura 6-30) contêm ambos D-alanina e D-glutamato. Os D-aminoácidos são produzidos diretamente a partir dos isômeros L, por ação de aminoácidos-racemases, que têm piridoxal-fosfato como cofator (ver Figura 18-6). A racemização de aminoácidos é de grande importância para o metabolismo bacteriano, e enzimas como a alanina-racemase são alvos importantes para agentes farmacêuticos. Um desses agentes, a **L-fluoralanina**, está sendo testado como fármaco antibacteriano. Outro, a **ciclosserina**, é utilizado no tratamento da tuberculose. Contudo, uma vez que esses inibidores também afetam algumas enzimas humanas que utilizam PLP, eles potencialmente apresentam efeitos colaterais indesejáveis.



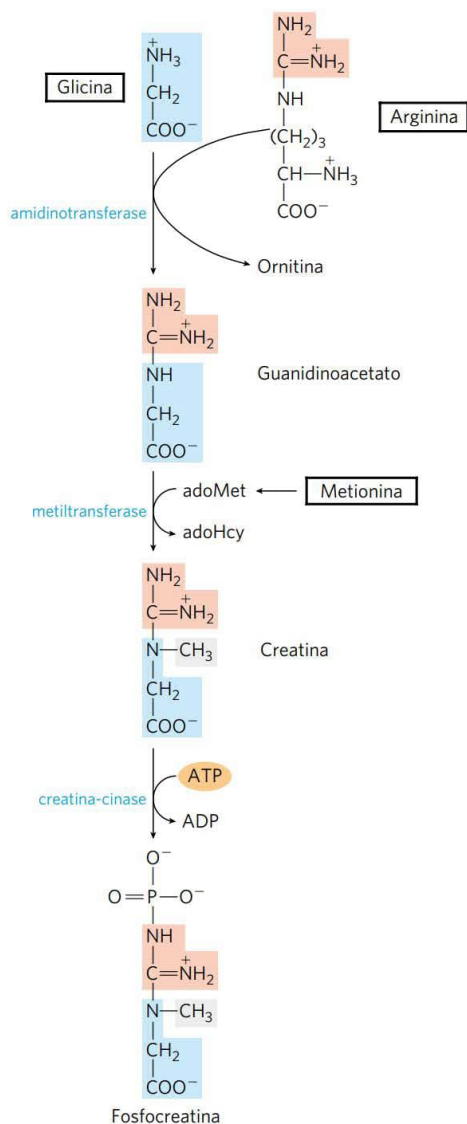


FIGURA 22-28 Biossíntese de creatina e fosfocreatina. A creatina é sintetizada a partir de três aminoácidos: glicina, arginina e metionina. Esta via mostra a versatilidade dos aminoácidos como precursores de outras biomoléculas nitrogenadas.

Aminoácidos aromáticos são precursores de muitas substâncias de origem vegetal

A fenilalanina, a tirosina e o triptofano são convertidos em vários compostos importantes nas plantas. O polímero rígido **lignina**, derivado da fenilalanina e da tirosina, está atrás apenas da celulose em abundância nos tecidos vegetais. A estrutura do polímero de lignina é complexa e não está bem esclarecida. O triptofano também é o precursor do hormônio de crescimento em plantas, o indol-3-acetato, ou **auxina** (Figura 22-30a), importante para a regulação de uma ampla gama de processos biológicos nos vegetais.

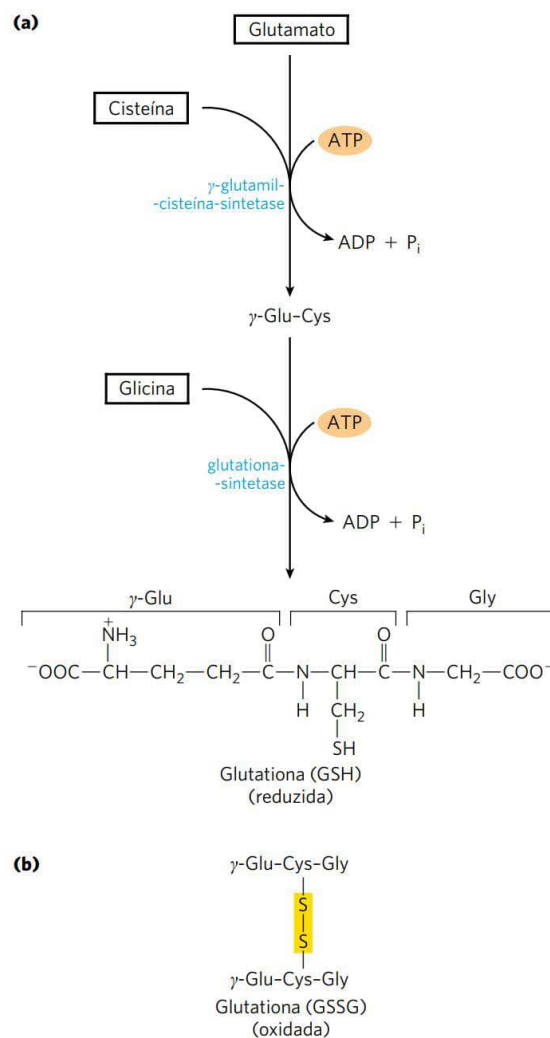


FIGURA 22-29 Metabolismo da glutatona. (a) Biossíntese da glutatona. (b) Forma oxidada da glutatona.

A fenilalanina e a tirosina também originam muitos produtos naturais de importância comercial, incluindo os taninos, que inibem a oxidação em vinhos; os alcaloides, como a morfina, que apresentam potentes efeitos fisiológicos; e condimentos ou aromatizantes encontrados em óleo de canela (Figura 22-30b), noz-moscada, cravo-da-índia, baunilha, pimenta vermelha e outros produtos.

Aminas biológicas são produtos da descarboxilação dos aminoácidos



Muitos neurotransmissores importantes são aminas primárias ou secundárias, derivadas de aminoácidos por meio de vias simples. Além disso, algumas poliaminas que formam complexos com o DNA são derivadas do aminoácido ornitina, intermediário do ciclo da ureia. Um denominador comum de muitas dessas vias é a descarboxilação dos aminoácidos, outra reação que requer PLP (ver Figura 18-6).

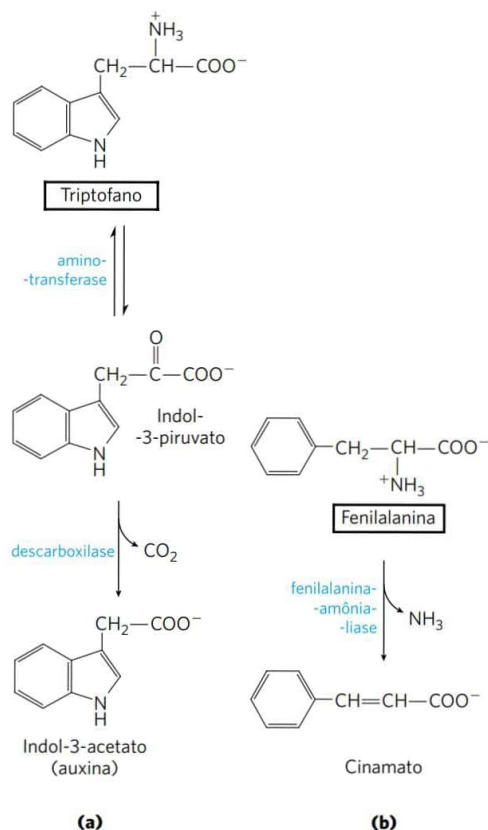


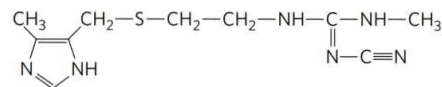
FIGURA 22-30 Biossíntese de dois compostos vegetais a partir de aminoácidos. (a) Indol-3-acetato (auxina) e (b) cinamato (confere aroma à canela).

A síntese de alguns neurotransmissores está ilustrada na **Figura 22-31**. A tirosina origina uma família de catecolaminas, que inclui a **dopamina**, a **noradrenalina** e a **adrenalina**. Os níveis das catecolaminas correlacionam-se, entre outras coisas, com variações na pressão sanguínea. A doença de Parkinson, um distúrbio neurológico, está associada com uma menor produção de dopamina e tem sido tradicionalmente tratada pela administração de L-dopa. A produção em excesso de dopamina no cérebro pode estar ligada a transtornos psiquiátricos, como a esquizofrenia.

A descarboxilação do glutamato origina o **γ -aminobutirato (GABA)**, um neurotransmissor inibitório. Uma baixa produção de GABA está associada com crises epiléticas. Análogos do GABA são utilizados no tratamento da epilepsia e da hipertensão. Pode-se também aumentar os níveis de GABA administrando-se inibidores da enzima de degradação do GABA, a GABA-aminotransferase. Outro neurotransmissor importante, a **serotonina**, é produzido a partir do triptofano, em uma via constituída por dois passos.

A histidina sofre descarboxilação, originando **histamina**, um poderoso vasodilatador em tecidos animais. A histamina é liberada em grandes quantidades como parte da resposta alérgica e estimula a secreção ácida no estômago.

Um número crescente de agentes farmacêuticos está sendo projetado para interferir com a síntese ou com a ação da histamina. Um exemplo importante é o antagonista do receptor da histamina, a **cimetidina** (Tagamet), um análogo estrutural da histamina:



Esse composto auxilia na cura de úlceras duodenais pela inibição da secreção gástrica de ácido.

Poliaminas, como a **espermina** e a **espermidina**, envolvidas na condensação do DNA, são derivadas da metionina e da ornitina pela via mostrada na **Figura 22-32**. O primeiro passo é a descarboxilação da ornitina, um precursor da arginina (Figura 22-12). A **ornitina-descarboxilase**, uma enzima que requer PLP, é alvo de diversos inibidores poderosos utilizados como agentes farmacêuticos (ver Quadro 6-3). ■

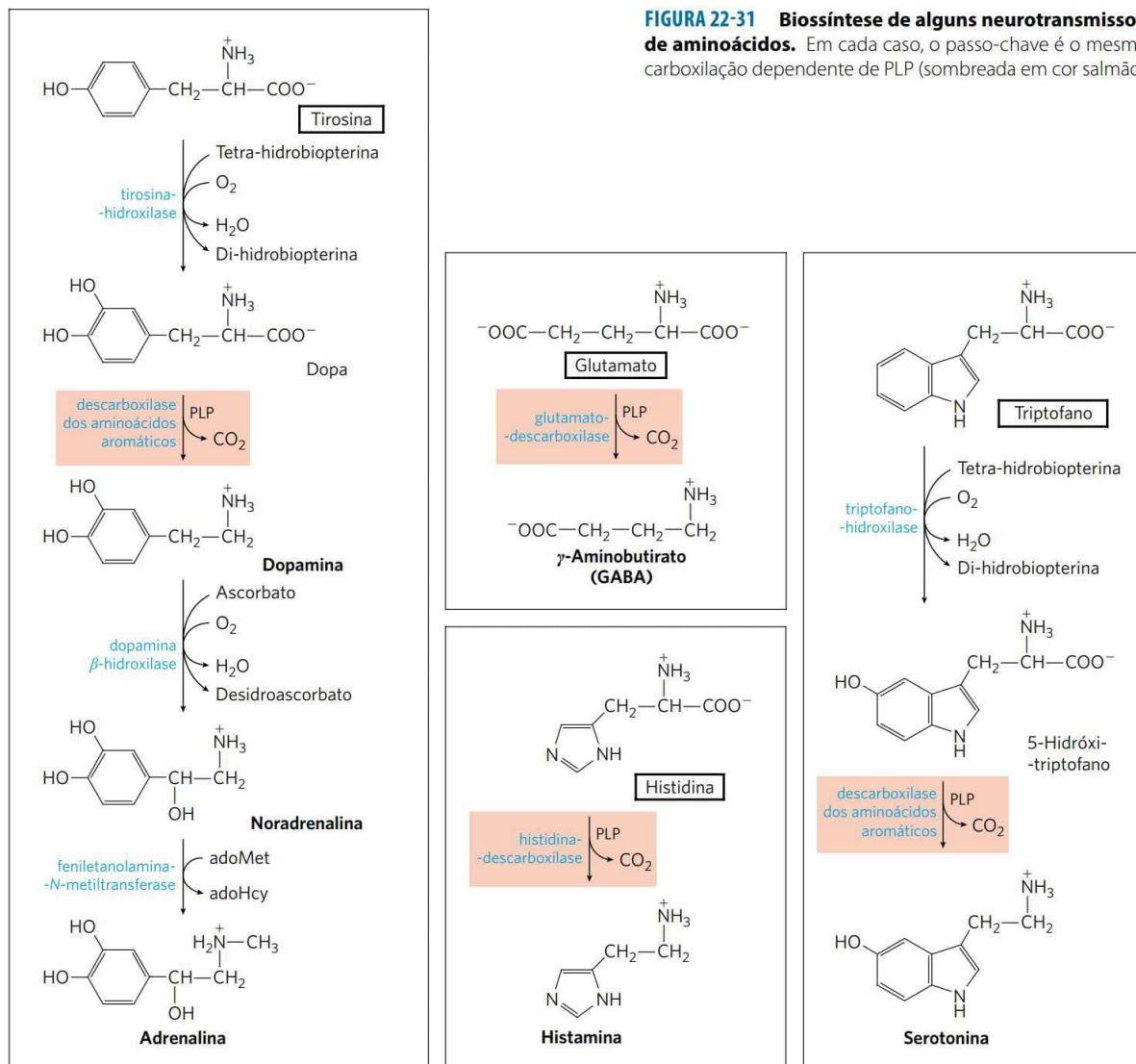
A arginina é precursora na síntese biológica de óxido nítrico

Um achado surpreendente, em meados da década de 1980, foi o papel do óxido nítrico (NO) – anteriormente apenas conhecido como componente poluidor do ar – como importante mensageiro biológico. Essa substância gasosa simples difunde-se facilmente através das membranas, embora sua alta reatividade restrinja seu raio de difusão para cerca de 1 mm a partir de seu ponto de síntese. Em seres humanos, o NO desempenha papéis em uma ampla gama de processos fisiológicos, incluindo neurotransmissão, coagulação sanguínea e controle da pressão sanguínea. Seu modo de ação é descrito no Capítulo 12 (ver Seção 12.5).

O óxido nítrico é sintetizado a partir da arginina em uma reação dependente de NADPH, catalisada pela óxido nítrico-sintase (**Figura 22-33**), enzima dimérica estruturalmente relacionada à NADPH-citocromo-P-450-redutase (ver Quadro 21-1). A reação é uma oxidação com transferência de cinco elétrons. Cada subunidade da enzima contém ligada uma molécula de cada um de quatro cofatores diferentes: FMN, FAD, tetra-hidrobiopterina e heme contendo Fe^{3+} . O NO é uma molécula instável e não pode ser armazenada. Sua síntese é estimulada pela interação da óxido nítrico-sintase com Ca^{2+} -calmodulina (ver Figura 12-12).

RESUMO 22.3 Moléculas derivadas de aminoácidos

- Muitas biomoléculas importantes são derivadas dos aminoácidos. A glicina é um precursor de porfirinas. A degradação do heme (ferro-porfirina) produz a bilirrubina, que é convertida em pigmentos biliares, com diversas funções fisiológicas.
- A glicina e a arginina originam a creatina e a fosfocreatina, um tampão energético. A glutatona, formada a partir de três aminoácidos, é um importante agente redutor na célula.
- As bactérias sintetizam D-aminoácidos a partir de L-aminoácidos, por meio de reações de racemização que



requerem piridoxal-fosfato. Os D-aminoácidos são comumente encontrados em certas paredes bacterianas e em certos antibióticos.

- As plantas sintetizam muitas substâncias a partir de aminoácidos aromáticos. A descarboxilação dependente de PLP de alguns aminoácidos produz importantes aminas biológicas, incluindo neurotransmissores.
- A arginina é precursora do óxido nítrico, um mensageiro biológico.

22.4 Biossíntese e degradação de nucleotídeos

Como discutido no Capítulo 8, os nucleotídeos apresentam uma variedade de funções importantes em todas as células. Eles são precursores do DNA e do RNA; são carreadores essenciais de energia química – papel desempenhado basi-

camente pelo ATP e, em parte, pelo GTP; são componentes dos cofatores NAD, FAD, S-adenosilmetionina e coenzima A, assim como de intermediários biossintéticos ativados, como UDP-glicose e CDP-diacilglicerol; e alguns deles, como o cAMP e o cGMP, são também segundos mensageiros celulares.

Dois tipos de vias levam aos nucleotídeos: as **vias de novo** e as **vias de recuperação**. A síntese *de novo* dos nucleotídeos inicia com seus precursores metabólicos: aminoácidos, ribose-5-fosfato, CO_2 e NH_3 . As vias de recuperação reciclam as bases livres e os nucleosídeos liberados a partir da degradação de ácidos nucleicos. Ambos os tipos de vias são importantes no metabolismo celular e são discutidos nesta seção.

As vias *de novo* para a biossíntese de purinas e pirimidinas parecem ser quase idênticas em todos os organismos vivos. Uma observação notável é que as bases livres guanina, adenina, timina, citidina e uracila *não* são interme-

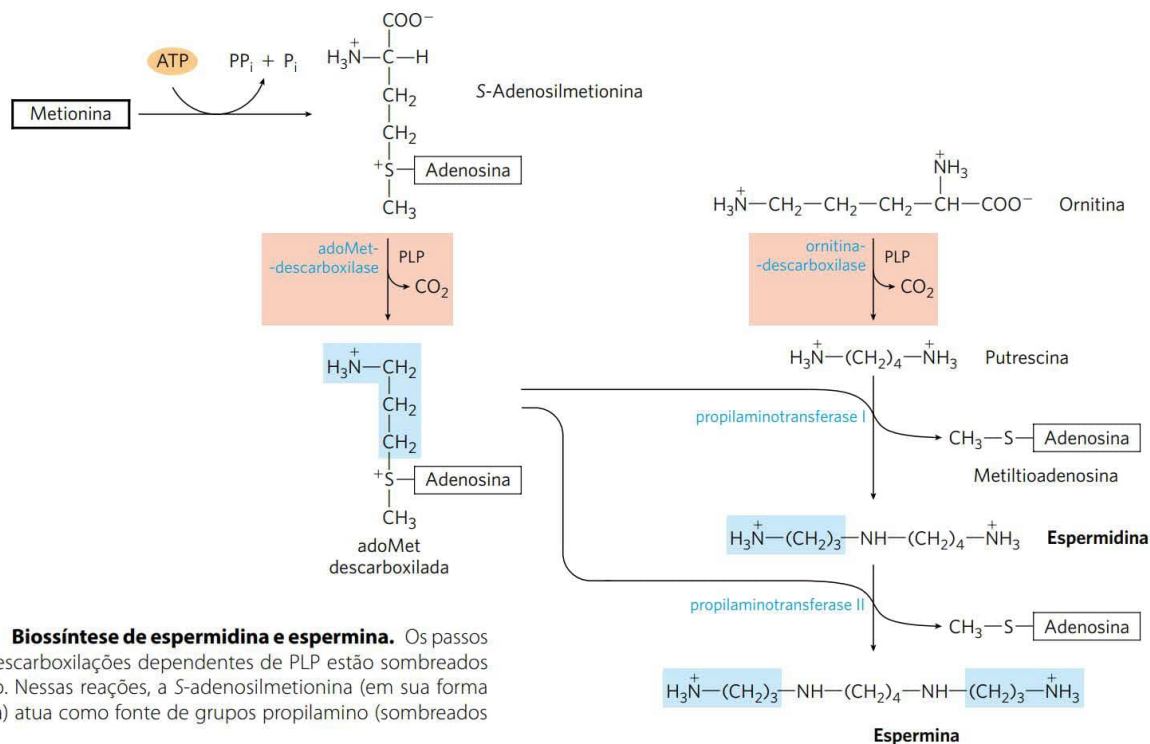


FIGURA 22-32 Biossíntese de espermidina e espermina. Os passos envolvendo descarboxilações dependentes de PLP estão sombreados em cor salmão. Nessas reações, a S-adenosilmetionina (em sua forma descarboxilada) atua como fonte de grupos propilamino (sombreados em azul).

diárias nessas vias, isto é, as bases não são sintetizadas e então ligadas à ribose, como se poderia esperar. A estrutura do anel púrico é construída ligada à ribose durante todo o processo, com a adição de um ou de poucos átomos por vez. O anel pirimídico é sintetizado como **orotato**, ligado à ribose-fosfato e, então, convertido nos nucleotídeos pirimídicos comuns necessários para a síntese dos ácidos nucleicos. Embora as bases livres não sejam intermediárias nas vias *de novo*, elas são intermediárias em algumas das vias de recuperação.

Diversos precursores importantes são compartilhados pelas vias *de novo* para a síntese de pirimidinas e purinas. O fosforibosil-pirofosfato (PRPP) é importante para a síntese de ambas e, nessas vias, a estrutura da ribose é man-

tida no nucleotídeo produzido, ao contrário do seu destino nas vias para a biossíntese de triptofano e histidina, discutidas anteriormente. Um aminoácido é um precursor importante em cada tipo de via: a glicina para as purinas e o aspartato para as pirimidinas. A glutamina é, novamente, a mais importante fonte de grupos amina – em cinco passos distintos das vias *de novo*. O aspartato também é utilizado como fonte de um grupo amina em dois dos passos das vias das purinas.

Duas outras características devem ser mencionadas. Primeiro, existem evidências, sobretudo na via de síntese *de novo* das purinas, de que as enzimas estejam presentes na célula como grandes complexos multienzimáticos, tema recorrente na discussão do metabolismo. Segundo,

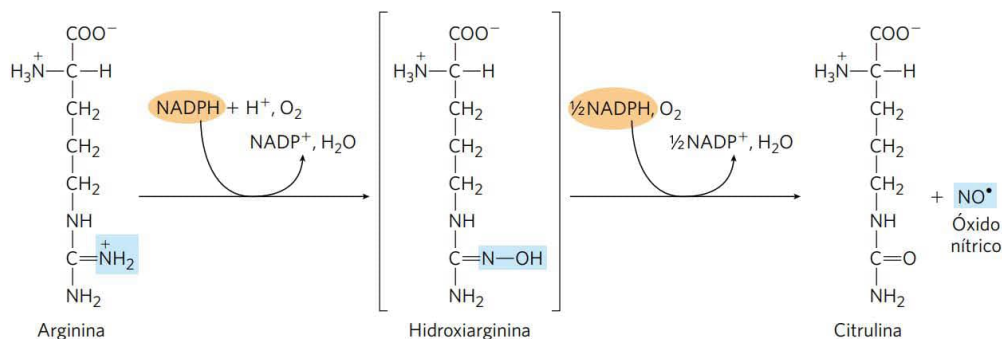


FIGURA 22-33 Biossíntese de óxido nítrico. Ambos os passos são catalisados pela óxido nítrico-sintase. O nitrogênio do NO provém do grupo guanidino da arginina.

os conjuntos celulares de nucleotídeos (outros que não o ATP) são bastante pequenos, talvez 1% ou menos das quantidades necessárias para a síntese de DNA celular. Assim, as células devem continuar a sintetizar nucleotídeos durante a síntese de ácidos nucleicos e, em alguns casos, a síntese de nucleotídeos pode limitar as velocidades de replicação e de transcrição do DNA. Em função da importância desses processos nas células em divisão, agentes que inibem a síntese de nucleotídeos se tornaram especialmente importantes em medicina.

Agora, serão examinadas as vias biossintéticas para os nucleotídeos púricos e pirimídicos e sua regulação, a formação de desoxinucleotídeos e a degradação de purinas e pirimidinas em ácido úrico e ureia. A seção será finalizada com uma discussão a respeito de agentes quimioterápicos que afetam a síntese de nucleotídeos.

A síntese *de novo* de nucleotídeos púricos inicia com o PRPP



John M. Buchanan, 1917-2007
[Fonte: cortesia do MIT Museum.]

Os dois nucleotídeos púricos precursores dos ácidos nucleicos são 5'-monofosfato de adenosina (AMP; adenilil) e 5'-monofosfato de guanossina (GMP; guanilato), os quais contêm as bases púricas adenina e guanina. A **Figura 22-34** mostra a origem dos átomos de carbono e de nitrogênio do sistema de anéis púricos, conforme determinado por John M. Buchanan, utilizando experimentos com marcadores isotópicos em aves. A via detalhada para a biossíntese de purinas foi elucidada principalmente por Buchanan e por G. Robert Gre-

enberg, na década de 1950.

No primeiro passo comprometido com a via, um grupo amina, doado pela glutamina, é ligado ao C-1 do PRPP (**Figura 22-35**). A **5-fosforribosilamina** resultante é altamente instável, com meia-vida de 30 segundos em pH 7,5. O anel púrico é depois construído sobre essa estrutura. A via aqui descrita é idêntica em todos os organismos, com exceção de um passo que difere nos eucariotos superiores, como observado a seguir.

O segundo passo é a adição de três átomos doados pela glicina (**Figura 22-35**, etapa 2). Um ATP é consumido para ativar o grupo carboxila da glicina (na forma de um acil-fosfato) para essa reação de condensação. O grupo amina da glicina, que foi adicionado, é então formilado pelo N^{10} -formiltetra-hidrofolato (etapa 3), e um nitrogênio é doado pela glutamina (etapa 4) antes que a desidratação e o fechamento do anel formem o anel imidazólico do núcleo púrico, com cinco membros, na forma de 5-aminoimidazol-ribonucleotídeo (AIR; etapa 5).

Nesse ponto, três dos seis átomos necessários para o segundo anel da estrutura das purinas estão colocados no lugar. Para completar o processo, um grupo carboxila

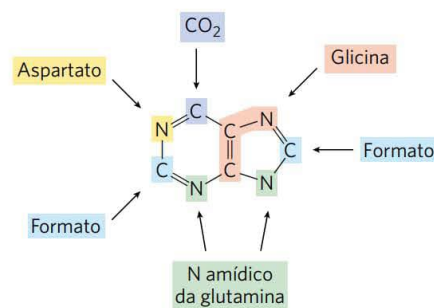


FIGURA 22-34 Origem dos átomos no anel das purinas. Essa informação foi obtida a partir de experimentos utilizando isótopos, com precursores marcados com ^{14}C ou ^{15}N . O formato é obtido na forma de N^{10} -formiltetra-hidrofolato.

é inicialmente adicionado (etapa 6). Essa carboxilação é incomum pelo fato de não requerer biotina, mas utilizar bi-carbonato, geralmente presente em soluções aquosas. Um rearranjo transfere o carboxilato do grupo amina exocíclico para a posição 4 do anel imidazólico (etapa 7). As etapas 6 e 7 ocorrem apenas em bactérias e fungos. Em eucariotos superiores, incluindo os seres humanos, o 5-aminoimidazol-ribonucleotídeo produzido na etapa 5 é carboxilado diretamente em carboxiaminoimidazol-ribonucleotídeo, em uma única etapa, em vez de duas (etapa 6a). A enzima que catalisa essa reação é a AIR-carboxilase.

O aspartato agora doa seu grupo amina em duas etapas (8 e 9): formação de uma ligação amida, seguindo-se a eliminação do esqueleto de carbono do aspartato (como fumarato). (Lembre-se de que o aspartato desempenha um papel análogo em duas etapas do ciclo da ureia; ver **Figura 18-10**.) O último carbono é doado pelo N^{10} -formiltetra-hidrofolato (etapa 10), e ocorre um segundo fechamento de anel, produzindo o segundo anel fundido ao núcleo púrico (etapa 11). O primeiro intermediário com um anel púrico completo é o **inosinato (IMP)**.

Assim como nas vias biossintéticas do triptofano e da histidina, as enzimas da síntese do IMP parecem estar organizadas como grandes complexos multienzimáticos na célula. Novamente, evidências surgem da existência de polipeptídeos únicos com diversas funções, alguns catalisando passos não sequenciais da via. Nas células eucarióticas de organismos como fungos, moscas-da-fruta e galinhas, as etapas 1, 3 e 5 da **Figura 22-35** são catalisadas por uma proteína multifuncional. Outra proteína multifuncional catalisa as etapas 10 e 11. Em seres humanos, uma enzima multifuncional combina as atividades da AIR-carboxilase e da SAICAR-sintetase (etapas 6a e 8). Nas bactérias, essas atividades são encontradas em proteínas separadas, mas essas proteínas podem formar um grande complexo não covalente. É provável que a canalização dos intermediários das reações de uma enzima até a seguinte, permitida por esses complexos, seja especialmente importante no caso de intermediários instáveis, como a 5-fosforribosilamina.

A conversão de inosinato em adenilil requer a inserção de um grupo amina derivado do aspartato (**Figura 22-36**); isso ocorre por meio de duas reações semelhan-

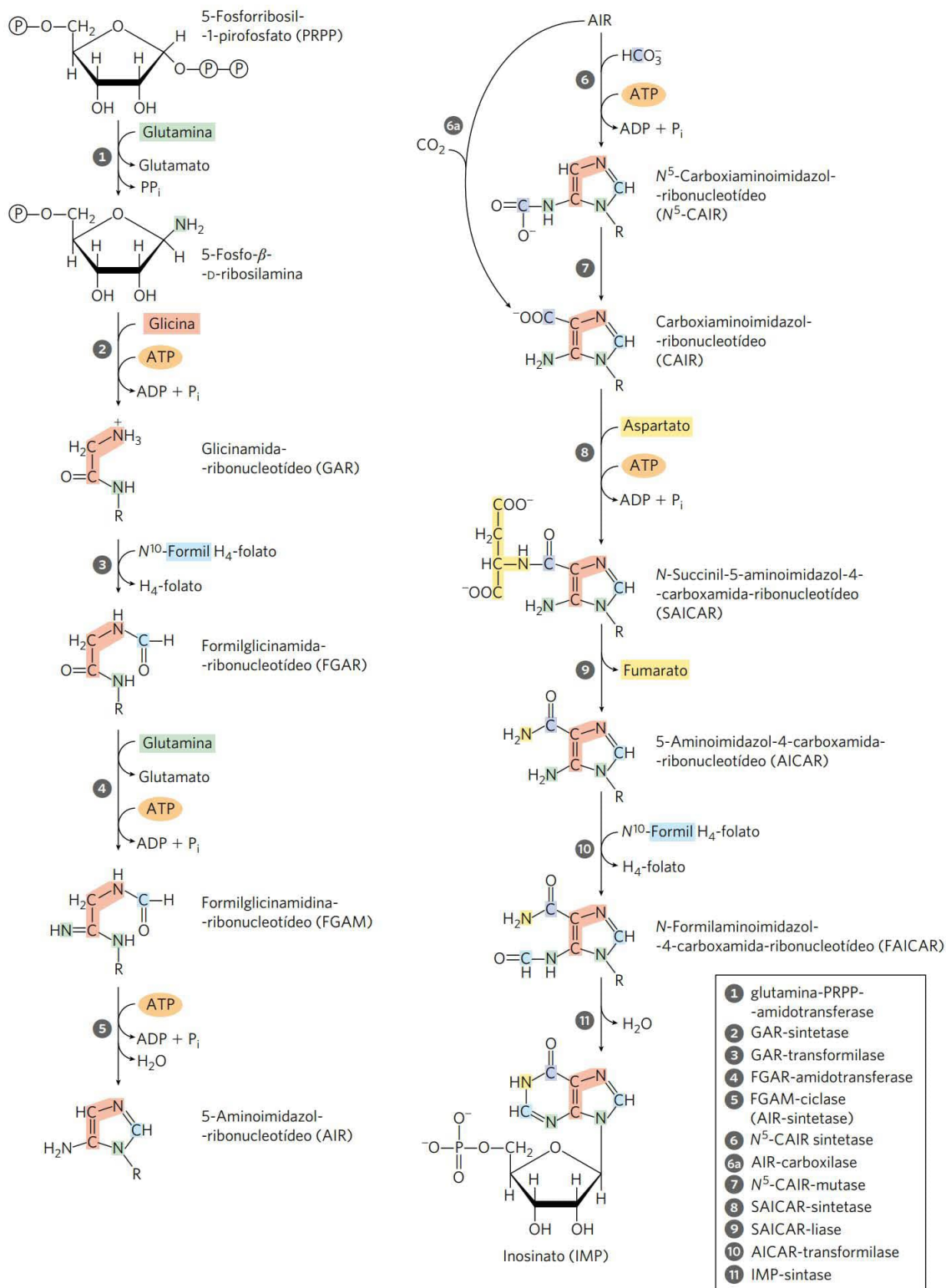


FIGURA 22-35 Síntese de novo de nucleotídeos púricos: construção do anel púrico do inosinato (IMP). Cada adição ao anel púrico está sombreada de forma equivalente ao código de cores usado na Figura 22-34. Após a etapa 2, R simboliza o grupo 5-fosfo-D-ribosila, sobre o qual o anel púrico é construído. A formação de 5-fosforribosilamina (etapa 1) é o primeiro passo comprometido na síntese de purinas. Observe que o produto da etapa 9, AICAR, é remanescente do ATP liberado durante a biossíntese de histidina (ver Figura 22-22, etapa 5). As abreviações são fornecidas para a maioria dos intermediários, para simplificar a designação das enzimas. A etapa 6a é uma via alternativa do AIR ao CAIR, que ocorre em eucariotos superiores.

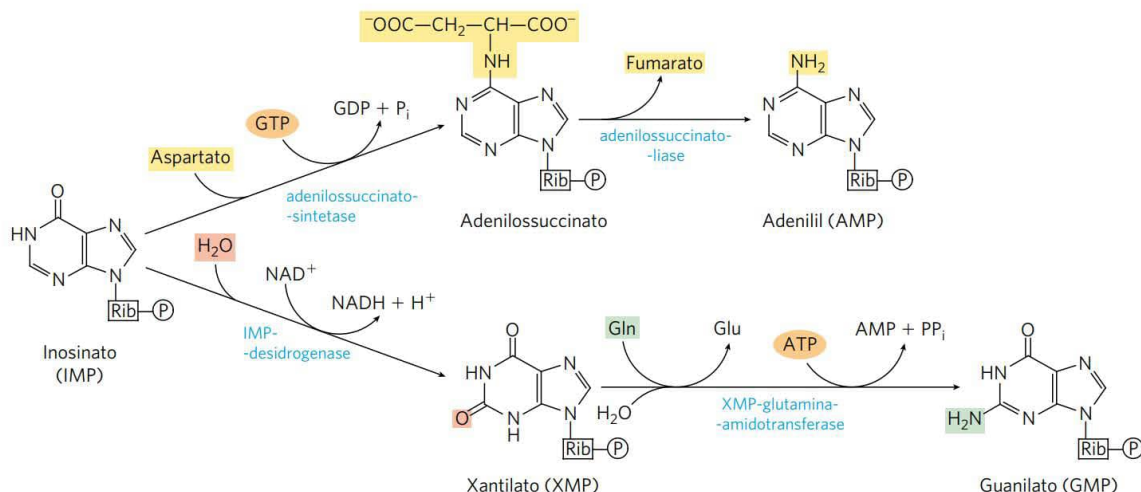


FIGURA 22-36 Biossíntese de AMP e GMP a partir de IMP.

tes àquelas utilizadas para introduzir o N-1 do anel púrico (Figura 22-35, etapas 8 e 9). Uma diferença crucial é que o GTP, e não o ATP, é a fonte do fosfato de alta energia para a síntese de adenilossuccinato. O guanilato é produzido pela oxidação dependente de NAD⁺ no C-2 do inosinato, seguindo-se a adição de um grupo amina derivado da glutamina. Na etapa final, um ATP é clivado em AMP e PP_i (Figura 22-36).

A biossíntese de nucleotídeos púricos é regulada por retroalimentação negativa

Três mecanismos principais de retroalimentação cooperam na regulação da velocidade geral da síntese *de novo* de nucleotídeos púricos e das velocidades relativas de formação dos dois produtos finais, adenilil e guanilato (Figura 22-37). O primeiro mecanismo é exercido sobre a primeira reação que é exclusiva da síntese de purinas: a transferência de um grupo amina para o PRPP para formar 5-fosforribosilamina. Essa reação é catalisada pela enzima alostérica glutamina-PRPP-amidotransferase, que é inibida pelos produtos finais IMP, AMP e GMP. AMP e GMP atuam sinergicamente nessa inibição concertada. Assim, sempre que AMP ou GMP se acumulam e estão presentes em excesso, o primeiro passo de sua biossíntese a partir de PRPP é parcialmente inibido.

No segundo mecanismo de controle, exercido sobre um estágio posterior, um excesso de GMP na célula inibe a formação de xantilato a partir de inosinato, pela IMP-desidrogenase, sem afetar a formação de AMP. Por sua vez, um acúmulo de adenilil inibe a formação de adenilossuccinato pela adenilossuccinato-sintetase, sem afetar a biossíntese de GMP. Quando ambos os produtos estão presentes em quantidades suficientes, o IMP acumula-se e inibe uma etapa anterior na via; este é um outro exemplo da estratégia regulatória, denominada **inibição sequencial por retroalimentação**. No terceiro mecanismo, o GTP é necessário para a conversão de IMP em AMP, ao passo que o ATP é necessário para a conversão de IMP em GMP (Figura

22-36), arranjo recíproco que tende a equilibrar a síntese dos dois ribonucleotídeos.

O último mecanismo de controle é a inibição da síntese de PRPP pela regulação alostérica da ribose-fosfato-pirofosfocinase. Essa enzima é inibida por ADP e GDP, além de metabólitos de outras vias para as quais o PRPP é o ponto de partida.

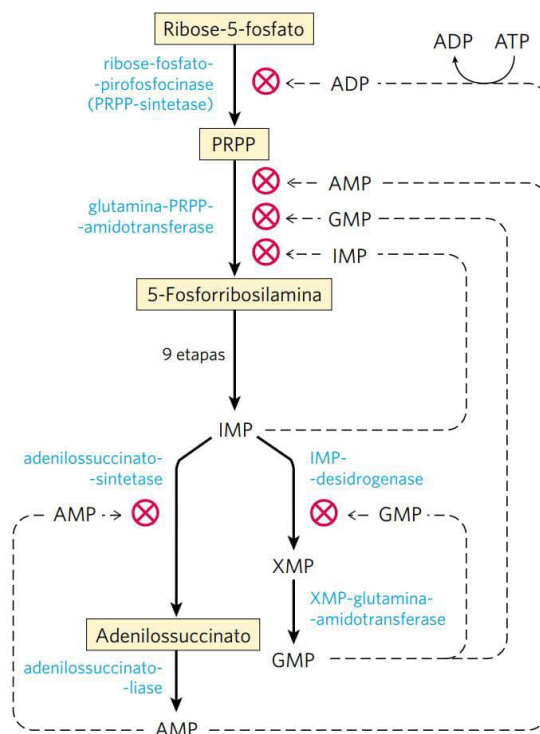


FIGURA 22-37 Mecanismos reguladores na biossíntese de nucleotídeos da adenina e da guanina em *E. coli*. A regulação dessas vias difere em outros organismos.

Os nucleotídeos pirimídicos são sintetizados a partir de aspartato, PRPP e carbamoil-fosfato

Os ribonucleotídeos pirimídicos comuns são 5'-monofosfato de citidina (CMP; citidilato) e 5'-monofosfato de uridina (UMP; uridilato), os quais contêm as pirimidinas citosina e uracila. A biossíntese *de novo* dos nucleotídeos pirimídicos (**Figura 22-38**) ocorre de forma um pouco diferente em relação à síntese dos nucleotídeos púricos; o anel pirimídico de seis membros é sintetizado inicialmente, sendo, então, ligado à ribose-5-fosfato. Nesse processo, é necessário o carbamoil-fosfato, que também é intermediário no ciclo da ureia. No entanto, em animais, o carbamoil-fosfato necessário para a síntese da ureia é produzido na mitocôndria pela carbamoil-fosfato-sintetase I, ao passo que o carbamoil-fosfato necessário para a biossíntese de pirimidinas é produzido no citosol por uma forma diferente da enzima, a **carbamoil-fosfato-sintetase II**. Nas bactérias, uma única enzima fornece o carbamoil-fosfato para a síntese de arginina e pirimidinas. A enzima bacteriana tem três sítios ativos separados, distribuídos ao longo de um canal de aproximadamente 100 Å de comprimento (**Figura 22-39**). A carbamoil-fosfato-sintetase bacteriana fornece uma vívida ilustração da canalização de intermediários reacionais instáveis entre sítios ativos.

O carbamoil-fosfato reage com o aspartato, produzindo *N*-carbamoil-aspartato, no primeiro passo comprometido com a biossíntese de pirimidinas (**Figura 22-38**). Essa reação é catalisada pela **aspartato-transcarbamoilase**. Nas bactérias, esse passo é altamente regulado, e a aspartato-transcarbamoilase bacteriana é uma das enzimas alostéricas mais bem estudadas (ver a seguir). Pela remoção de água do *N*-carbamoil-aspartato, uma reação catalisada pela **di-hidro-ototase**, o anel pirimídico é fechado, formando *L*-di-hidro-ototato. Esse composto é oxidado, produzindo o derivado pirimídico ototato, reação na qual NAD^+ é oceptor final de elétrons. Nos eucariotos, as primeiras três enzimas dessa via – carbamoil-fosfato-sintetase II, aspartato-transcarbamoilase e di-hidro-ototase – são parte de uma única proteína trifuncional. A proteína, conhecida pelo acrônimo CAD, contém três cadeias polipeptídicas idênticas (cada qual com M_r 230.000), cada uma delas com sítios ativos para todas as três reações. Isso sugere que grandes complexos multienzimáticos possam ser a regra nessa via.

Uma vez que o ototato esteja formado, a cadeia lateral de ribose-5-fosfato, fornecida mais uma vez pelo PRPP, é ligada, produzindo ototidilato (**Figura 22-38**). O ototidilato é então descarboxilado, originando uridilato, que é fosforilado até UTP. O CTP é formado a partir do UTP pela ação da **citidilato-sintetase**, com formação de um intermediário acil-fosfato (consumindo um ATP). O doador de nitrogênio normalmente é a glutamina, embora citidilato-sintetase de muitas espécies possam utilizar diretamente o NH_4^+ .

A biossíntese de nucleotídeos pirimídicos é regulada por retroalimentação negativa

A regulação da velocidade de síntese de nucleotídeos pirimídicos em bactérias ocorre, em grande parte, sobre a ação

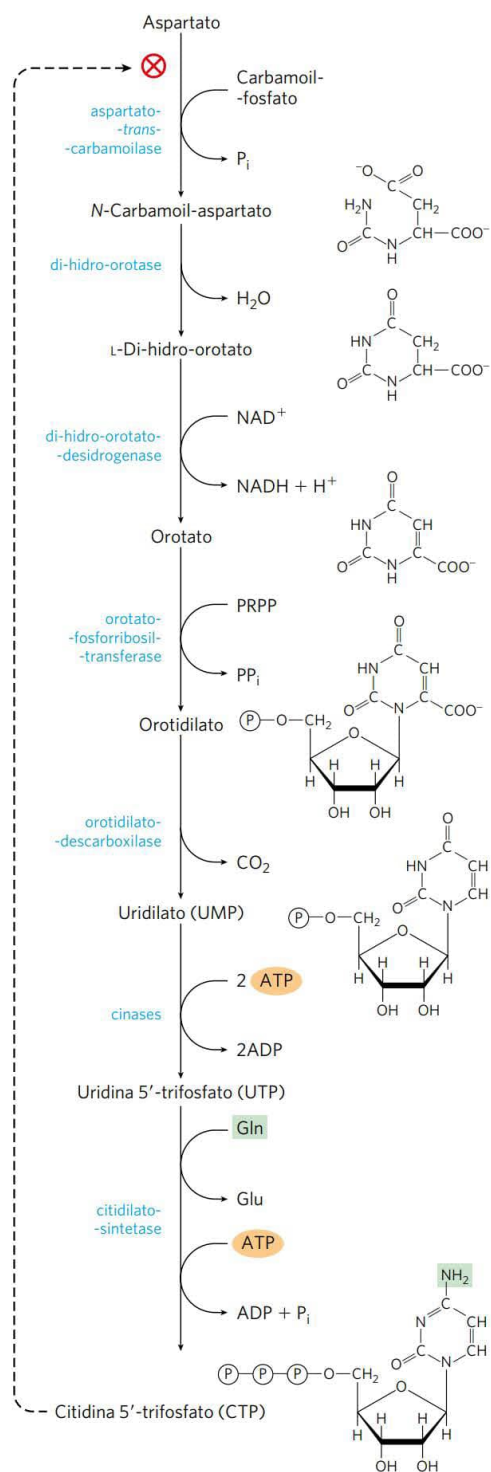


FIGURA 22-38 Síntese *de novo* de nucleotídeos pirimídicos: biossíntese de UTP e CTP via ototidilato. As pirimidinas são construídas a partir de carbamoil-fosfato e aspartato. A ribose-5-fosfato é, então, adicionada ao anel pirimídico completo pela ototato-fosforribosil-transferase. O primeiro passo nessa via (não mostrado aqui; ver Figura 18-11a) é a síntese de carbamoil-fosfato a partir de CO_2 , NH_4^+ e ATP. Em eucariotos, o primeiro passo é catalisado pela carbamoil-fosfato-sintetase II.

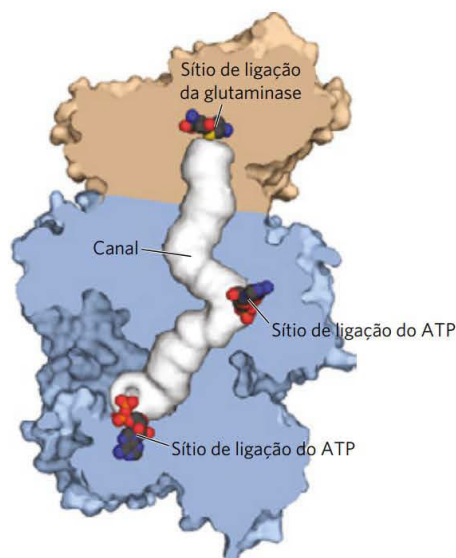


FIGURA 22-39 Canalização de intermediários na carbamoil-fosfato-sintetase bacteriana. A reação catalisada por essa enzima (e sua correspondente mitocondrial) está ilustrada na Figura 18-11a. A subunidade pequena e a grande são mostradas em bege-escuro e azul, respectivamente. O canal entre os sítios ativos (quase 100 Å de comprimento) é representado em branco. Uma molécula de glutamina liga-se à subunidade menor, doando seu nitrogênio amídico como NH_4^+ em uma reação do tipo glutamina-amidotransferase. O NH_4^+ entra no canal, que o conduz a um segundo sítio ativo, onde ele se combina com bicarbonato, em uma reação que requer ATP. O carbamato, então, retorna ao canal, para alcançar o terceiro sítio ativo, onde é fosforilado a carbamoil-fosfato usando ATP. Para a determinação desta estrutura, a enzima foi cristalizada com a ornitina ligada ao sítio de ligação da glutamina e ADP ligado aos sítios de ligação do ATP. [Fonte: derivada de PDB ID 1M6V, J. B. Thoden et al., *J. Biol. Chem.* 277:39.722, 2002.]

da aspartato-transcarbamoilase (ATCase), que catalisa a primeira reação da sequência e é inibida pelo CTP, o produto final da sequência (Figura 22-38). A molécula de ATCase bacteriana consiste em seis subunidades catalíticas e seis subunidades reguladoras (ver Figura 6-34). As subunidades catalíticas ligam as moléculas de substrato, e as subunidades alostéricas ligam o inibidor alostérico, o CTP. A molécula de ATCase completa, assim como suas subunidades, existe em duas conformações, ativa e inativa. Quando o CTP não estiver ligado às subunidades reguladoras, a enzima apresenta atividade máxima. À medida que o CTP se acumula e se liga às subunidades reguladoras, estas sofrem uma mudança em sua conformação. Essa mudança é transmitida às subunidades catalíticas, que, então, mudam para uma conformação inativa. O ATP impede essas mudanças induzidas pelo CTP. A **Figura 22-40** mostra os efeitos de reguladores alostéricos sobre a atividade da ATCase.

Nucleosídeos monofosfatados são convertidos em nucleosídeos trifosfatados

Os nucleotídeos a serem utilizados em vias biossintéticas geralmente são convertidos em nucleosídeos trifosfatados. As vias de conversão são comuns a todas as células. A fosfo-

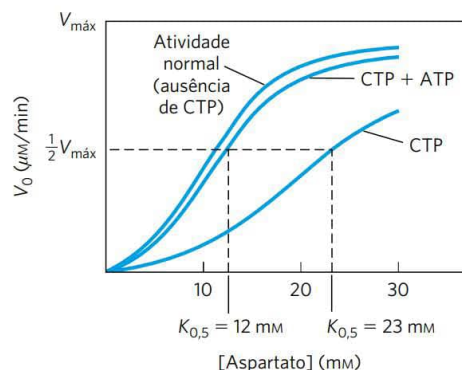
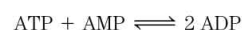


FIGURA 22-40 Regulação alostérica da aspartato-transcarbamoilase por CTP e ATP. A adição de 0,8 mM de CTP, o inibidor alostérico de ATCase, aumenta a $K_{0,5}$ para aspartato (curva inferior), reduzindo a taxa de conversão do aspartato a *N*-carbamoilaspartato. ATP, na concentração de 0,6 mM, reverte completamente a inibição por CTP (curva do meio).

rilção de AMP em ADP é promovida pela **adenilil-cinase**, na reação



O ADP assim formado é fosforilado, produzindo ATP, pelas enzimas glicolíticas ou por meio da fosforilação oxidativa.

O ATP também participa da formação dos demais nucleosídeos difosfatados, pela ação de uma classe de enzimas chamadas de **nucleosídeo-monofosfato-cinases**. Essas enzimas, geralmente específicas para determinada base e inespecíficas para o açúcar (ribose ou desoxirribose), catalisam a reação



Os eficientes sistemas celulares que fosforilam novamente o ADP a ATP tendem a impulsionar essa reação no sentido dos produtos.

Os nucleosídeos difosfatados são convertidos nos seus equivalentes trifosfatados pela ação de uma enzima ubíqua, **nucleosídeo-difosfato-cinase**, que catalisa a reação



Essa enzima é notável pelo fato de não ser específica para a base (purinas ou pirimidinas) ou para o açúcar (ribose ou desoxirribose). Essa não especificidade aplica-se tanto aoceptor do fosfato (A) quanto ao doador (D), embora o doador (NTP_D) seja quase invariavelmente o ATP, pois está presente em maiores concentrações que outros nucleosídeos trifosfatados em condições aeróbicas.

Os ribonucleotídeos são precursores dos desoxirribonucleotídeos

Os desoxirribonucleotídeos, os blocos constitutivos do DNA, são produzidos a partir dos ribonucleotídeos correspondentes, por redução direta do átomo de carbono 2' da D-ribose, formando o derivado 2'-desóxi. Por exemplo, a adenosina-difosfato (ADP) é reduzida a 2'-desoxiadenosina-difosfato (dADP) e a GDP é reduzida a dGDP. Essa

reação é, de certo modo, incomum, pelo fato de que a redução ocorre em um carbono não ativado; não são conhecidas reações químicas análogas muito próximas. A reação é catalisada pela **ribonucleotídeo-redutase**, mais bem caracterizada em *E. coli*, cujos substratos são ribonucleosídeos difosfatados.

A redução da porção D-ribose de um ribonucleosídeo difosfatado em 2'-desóxi-D-ribose requer um par de átomos de hidrogênio, que são doados, em última análise, pelo NADPH, via uma proteína carreadora de hidrogênios intermediária, a **tiorredoxina**. Essa proteína ubíqua tem uma função *redox* semelhante na fotossíntese (ver Figura 20-46) e em outros processos. A tiorredoxina tem pares de grupos —SH, que carregam átomos de hidrogênio do NADPH até o ribonucleosídeo difosfatado. Sua forma oxidada (dissulfeto) é reduzida pelo NADPH em uma reação catalisada pela **tiorredoxina-redutase** (Figura 22-41), e a tiorredoxina reduzida é, então, utilizada pela ribonucleotídeo-redutase para reduzir nucleosídeos difosfatados (NDP), produzindo desoxirribonucleosídeos difosfatados (dNDP). Uma segunda fonte de equivalentes redutores para a ribonucleotídeo-redutase é a glutatona (GSH). A glutatona serve como agente redutor para uma proteína semelhante à tiorredoxina, a **glutarredoxina**, que, então, transfere poder redutor à ribonucleotídeo-redutase (Figura 22-41).

A ribonucleotídeo-redutase é notável por seu mecanismo de reação, que fornece o exemplo mais bem caracterizado de algo que se pensava ser raro nos sistemas

biológicos, o envolvimento de radicais livres em transformações bioquímicas. A enzima da *E. coli* e da maioria dos eucariotos é um dímero $\alpha_2\beta_2$, com duas subunidades catalíticas α_2 e duas subunidades geradoras de radicais livres, β_2 (Figura 22-42). Cada subunidade catalítica contém dois tipos de sítios reguladores, como descrito a seguir. Os dois sítios ativos da enzima formam-se na interface entre as subunidades catalíticas (α_2) e geradoras de radicais livres (β_2). Em cada sítio ativo, a subunidade α contribui com dois grupos sulfidríla, necessários para a atividade, e as subunidades β_2 contribuem com um radical tirosila estável. As subunidades β_2 também apresentam um cofator ferro binuclear (Fe^{3+}), que ajuda a gerar e a estabilizar o

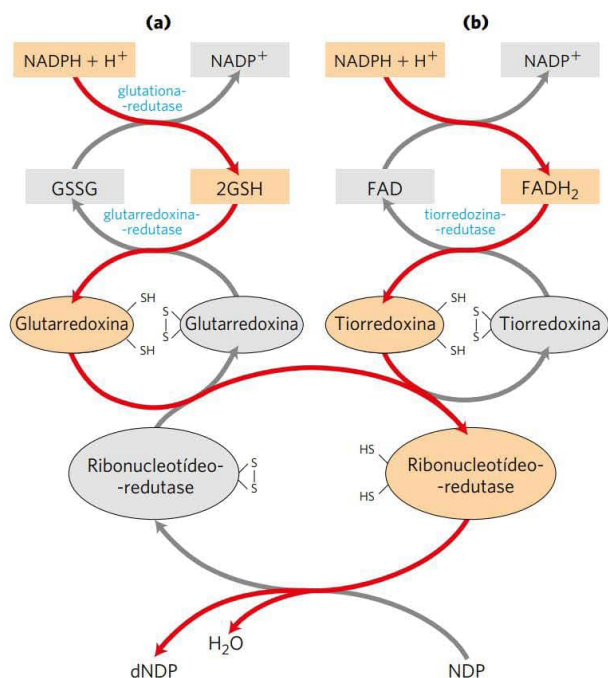


FIGURA 22-41 Redução de ribonucleotídeos a desoxirribonucleotídeos pela ribonucleotídeo-redutase. Os elétrons são transferidos (setas vermelhas) para a enzima a partir do NADPH, via (a) glutarredoxina ou (b) tiorredoxina. Os grupos sulfeto na glutarredoxina-reductase são fornecidos por duas moléculas de glutatona ligada (GSH; GSSG indica a glutatona oxidada). Observe que a tiorredoxina-reductase é uma flavoenzima, com FAD como grupo prostético.

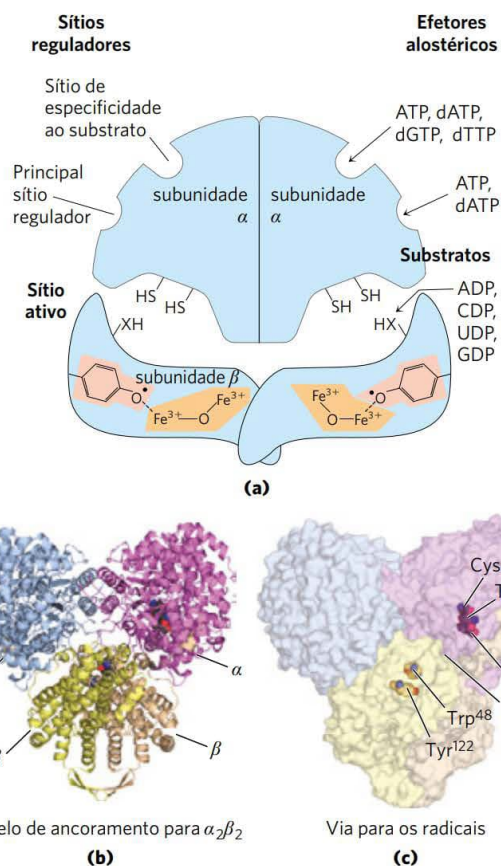
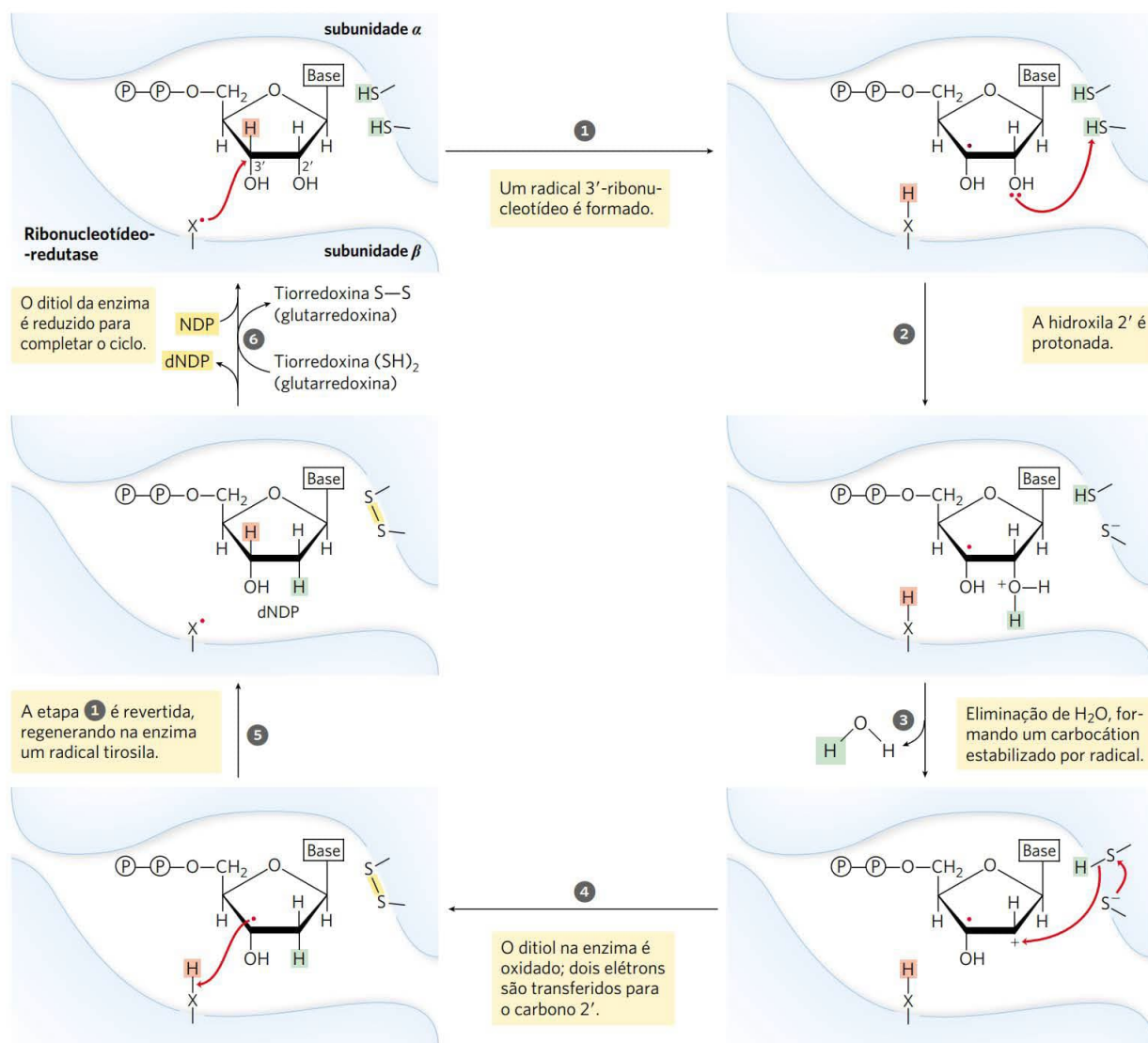


FIGURA 22-42 Ribonucleotídeo-redutase. (a) Um diagrama esquemático das estruturas das subunidades. Cada subunidade catalítica (α ; também chamada de R1) contém dois sítios regulatórios descritos na Figura 22-44 e dois resíduos Cys centrais para o mecanismo da reação. Cada uma das subunidades geradoras de radicais livres (β ; também chamada de R2) contém um resíduo de Tyr¹²² crucial e um centro binuclear de ferro. (b) A provável estrutura de $\alpha_2\beta_2$. (c) A provável via de formação de radicais a partir do Tyr¹²² inicial na subunidade β para o sítio ativo Cys⁴³⁹, que é usado no mecanismo mostrado na Figura 22-43. Vários resíduos de aminoácidos aromáticos participam na transferência de longo alcance do radical desde o ponto de sua formação na Tyr¹²² até o sítio ativo, onde o substrato nucleotídico está ligado. [Fontes: (a) informação de L. Thelander e P. Reichard, *Annu. Rev. Biochem.* 48:133, 1979. (b, c) Derivadas de PDB ID 3UUS, N. Ando et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108:21,046, 2011.]

radical Tyr^{122} (Figura 22-42). O radical tirosila está muito distante do sítio ativo para interagir diretamente com o sítio, mas diversos resíduos aromáticos formam uma via de longo alcance de transferência de radicais até o sítio ativo (Figura 22-42c). Um mecanismo provável para a reação da ribonucleotídeo-redutase está ilustrado na **Figura 22-43**. Em *E. coli*, fontes prováveis dos equivalentes redutores necessários para essa reação são a tiorredoxina e a glutarredoxina, como observado anteriormente.

Três classes de ribonucleotídeo-redutases foram descritas. Seus mecanismos (quando conhecidos) geralmente estão de acordo com o esquema na Figura 22-43, mas essas reações diferem quanto à identidade do grupo que fornece o radical no sítio ativo e quanto aos cofatores utilizados para gerá-lo. A enzima da *E. coli* (classe I) requer oxigênio para regenerar o radical tiroxila, se ele estiver inativado, de

modo que essa enzima somente funciona em um ambiente aeróbico. As enzimas de classe II, encontradas em outros microrganismos, apresentam 5'-desoxiadenosilcobalamina (ver Quadro 17-2) em vez de um centro binuclear de ferro. Enzimas de classe III evoluíram para atuar em ambientes anaeróbicos. A *E. coli* contém, quando cresce anaerobicamente, uma ribonucleotídeo-redutase adicional, de classe III; essa enzima contém um centro de ferro-enzofre (estruturalmente distinto do centro binuclear de ferro da enzima de classe I) e requer NADPH e *S*-adenosilmetionina para sua atividade. Ela utiliza como substratos nucleosídeos trifosfatados, em vez de nucleosídeos difosfatados. A evolução das diferentes classes de ribonucleotídeo-redutases para a produção de precursores do DNA em diferentes ambientes reflete a importância dessa reação no metabolismo dos nucleotídeos.



MECANISMO-FIGURA 22-43 Mecanismo proposto para a ribonucleotídeo-redutase. Na enzima de *E. coli* e na maioria dos eucariotos, os grupos tiol ativos estão na subunidade α . O radical $(-X^\bullet)$ no sítio ativo está na subunidade β e, na *E. coli*, é provavelmente um radical tilila da Cys^{439} (ver Figura 22-42).

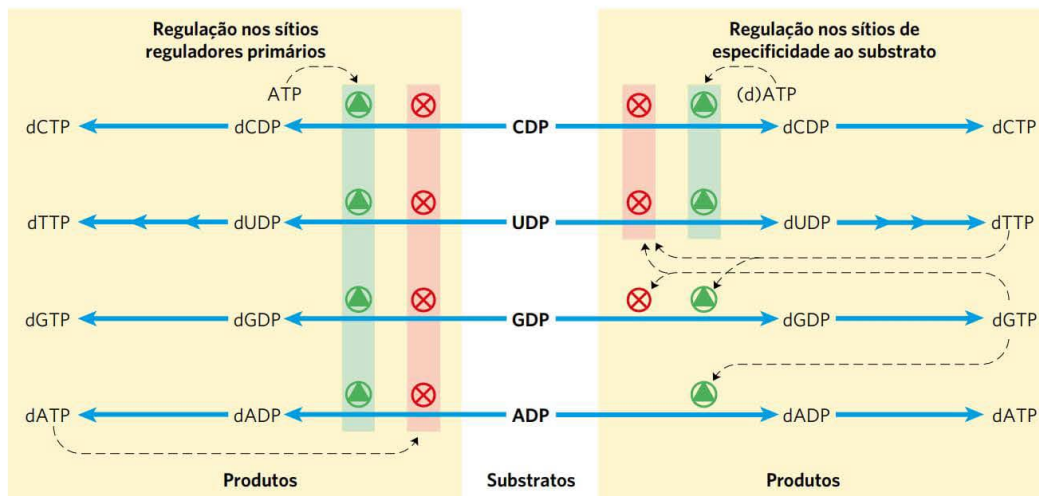


FIGURA 22-44 Regulação da ribonucleotídeo-redutase por desoxinucleosídeos trifosfatados. A atividade geral da enzima é afetada pela ligação de efetores ao sítio regulador primário (à esquerda). A especificidade da enzima ao substrato é afetada pela natureza da molécula efetora ligada ao segundo tipo de sítio regulador, o sítio de especificidade ao substrato (à direita). O diagrama indica inibição ou estimulação da atividade enzimática para os quatro diferentes substratos. A via desde o dUDP até o dTTP é descrita posteriormente (ver Figuras 22-46, 22-47).

A regulação da ribonucleotídeo-redutase da *E. coli* é incomum pelo fato de que não apenas sua *atividade*, mas sua *especificidade quanto ao substrato* é regulada pela ligação de moléculas efetoras. Cada subunidade α tem dois tipos de sítios regulatórios (Figura 22-42). Um tipo afeta a atividade geral da enzima e liga ou ATP, que ativa a enzima, ou dATP, que a inativa. O segundo tipo determina uma alteração na especificidade quanto ao substrato em resposta à molécula efetora – ATP, dATP, dTTP ou dGTP – que ali se liga (**Figura 22-44**). Quando ATP ou dATP está ligado, a redução de UDP e CDP é favorecida. Quando dTTP ou dGTP está ligado, a redução de GDP ou ADP, respectivamente, é estimulada. O esquema é projetado de forma a fornecer um conjunto equilibrado de precursores para a síntese de DNA. O ATP também é um ativador geral para a biossíntese e a redução

de ribonucleotídeos. A presença de dATP em pequenas quantidades aumenta a redução de nucleotídeos pirimídicos. Um suprimento excessivo de dNTP pirimídico é sinalizado por altos níveis de dTTP, que altera a especificidade em favor da redução de GDP. Níveis elevados de dGTP, por sua vez, deslocam a especificidade para a redução do ADP, e altos níveis de dATP inativam a enzima. Pensa-se que esses efetores induzam diversas conformações enzimáticas distintas, com diferentes especificidades.

Esses efeitos regulatórios são acompanhados e, possivelmente, mediados por grandes rearranjos estruturais na enzima. Quando a forma ativa da enzima da *E. coli* ($\alpha_2\beta_2$) é inibida pela adição do inibidor alostérico dATP, ocorre a formação de uma estrutura em anel $\alpha_4\beta_4$, com subunidades α_2 e β_2 alternadas (**Figura 22-45**). Nessa estrutura altera-

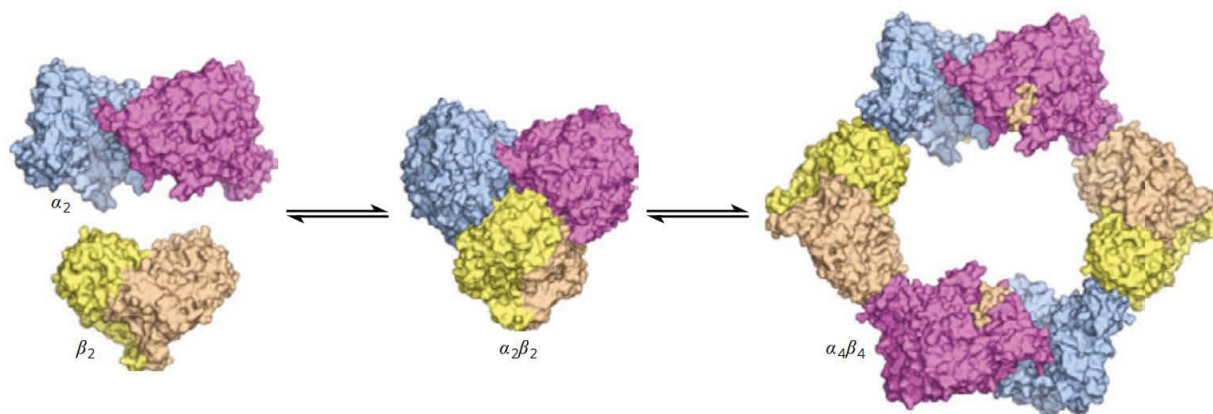


FIGURA 22-45 Oligomerização da ribonucleotídeo-redutase induzida pelo inibidor alostérico dATP. Em altas concentrações de dATP ($50 \mu\text{M}$), estruturas em forma de anel $\alpha_4\beta_4$ são formadas. Nessa conformação, os resíduos da via formadora de radicais ficam expostos ao solvente, bloqueando a reação com o radical e inibindo a enzima. A oligomerização é revertida em baixas concentrações de dATP. [Fonte: PDB ID 3UUS, N. Ando et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108:21,046, 2011.]

da, a via de formação de radicais de β para α é prejudicada, e os resíduos no caminho ficam expostos ao solvente, de modo que é efetivamente impedida a transferência de radicais, inibindo, assim, a reação. A formação das estruturas em anel $\alpha_4\beta_4$ é revertida quando os níveis de dATP são reduzidos. A ribonucleotídeo-redutase de levedura também sofre oligomerização na presença de dATP, formando uma estrutura hexamérica em anel, $\alpha_6\beta_6$.

O timidilato é derivado do dCDP e do dUMP

O DNA contém timina, em vez de uracila, e a via *de novo* até a timina envolve apenas desoxirribonucleotídeos. O precursor imediato do timidilato (dTMP) é o dUMP. Em bactérias, a via para o dUMP inicia com a formação de dUTP, seja por desaminação de dCTP ou por fosforilação do dUDP (Figura 22-46). O dUTP é convertido em dUMP por uma dUTPase. Esta última reação deve ser eficiente para manter baixos níveis de dUTP, impedindo a incorporação de uridilato ao DNA.

A conversão de dUMP em dTMP é catalisada pela **timidilato-sintase**. Uma unidade de um carbono, no estado de oxidação de hidroximetila ($-\text{CH}_2\text{OH}$) (Figura 18-17), é transferida do N^5, N^{10} -metilenotetra-hidrofolato para o dUMP, e então reduzida até um grupo metila (Figura 22-47). A redução ocorre à custa da oxidação do tetra-hidrofolato em di-hidrofolato, que é incomum em reações que necessitam de tetra-hidrofolato. (O mecanismo dessa reação é mostrado na Figura 22-53.) O di-hidrofolato é reduzido a tetra-hidrofolato pela **di-hidrofolato-redutase** – regeneração essencial para muitos processos que necessitam de tetra-hidrofolato. Em plantas e em pelo menos um protista, a timidilato-sintase e a di-hidrofolato-redutase residem em uma única proteína bifuncional.



Cerca de 10% dos seres humanos (e até 50% das pessoas em comunidades pobres) sofrem de deficiência de ácido fólico. Quando a deficiência é grave, os sintomas podem incluir doença cardíaca, câncer e alguns tipos de distúrbios encefálicos. Pelo menos alguns desses sintomas surgem da redução da síntese de timidilato, levando a uma incorporação anormal de uracila no DNA. A uracila é reconhecida pelos sistemas de reparo do DNA (descritos no Capítulo 25) e é removida do DNA. A presença de altos níveis de uracila no DNA leva a quebras da fita, que podem

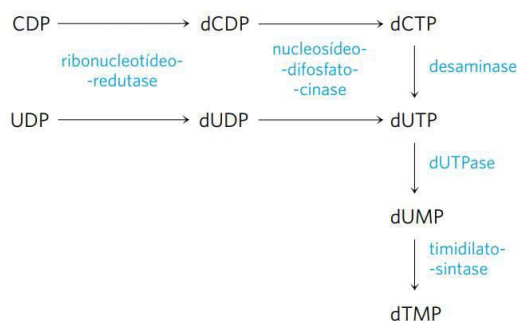


FIGURA 22-46 Biossíntese de timidilato (dTMP). As vias são mostradas iniciando com a reação catalisada pela ribonucleotídeo-redutase. A Figura 22-47 fornece detalhes da reação da timidilato-sintase.

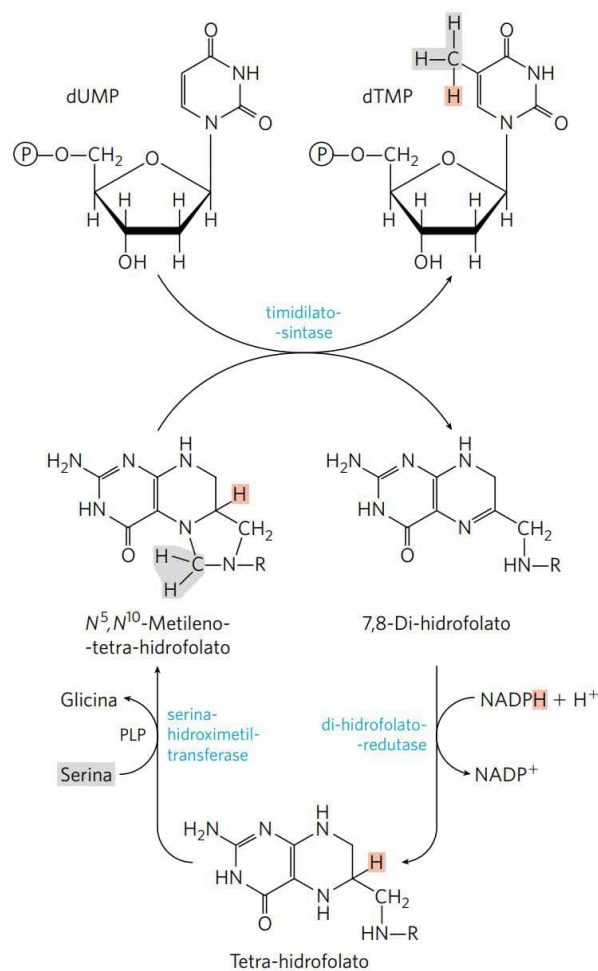


FIGURA 22-47 Conversão de dUMP em dTMP pelas enzimas timidilato-sintase e di-hidrofolato-redutase. A serina-hidroxi-metil-transferase é necessária para a regeneração da forma N^5, N^{10} -metileno do tetra-hidrofolato. Na síntese dTMP, todos os três hidrogênios do grupo metil adicionado são derivados do N^5, N^{10} -metileno-tetra-hidrofolato (em vermelho-claro e cinza).

afetar significativamente a função e a regulação do DNA nuclear, causando, por fim, os efeitos observados sobre o coração e o encéfalo, assim como aumento da mutagênese, que leva ao câncer. ■

A degradação de purinas e pirimidinas produz ácido úrico e ureia, respectivamente

Os nucleotídeos púricos são degradados por uma via na qual eles perdem seu fosfato por meio da ação da **5'-nucleotídeo-dase** (Figura 22-48). O adenilil produz adenosina, que é desaminada pela **adenosina-desaminase**, gerando inosina, a qual é hidrolisada, produzindo hipoxantina (sua base púrica) e D-ribose. A hipoxantina é sucessivamente oxidada a xantina e a ácido úrico pela **xantina-oxidase**, uma flavoenzima com um átomo de molibdênio e quatro centros de ferro-enxofre em seu grupo prostético. O oxigênio molecular é o aceptor de elétrons nessa complexa reação.

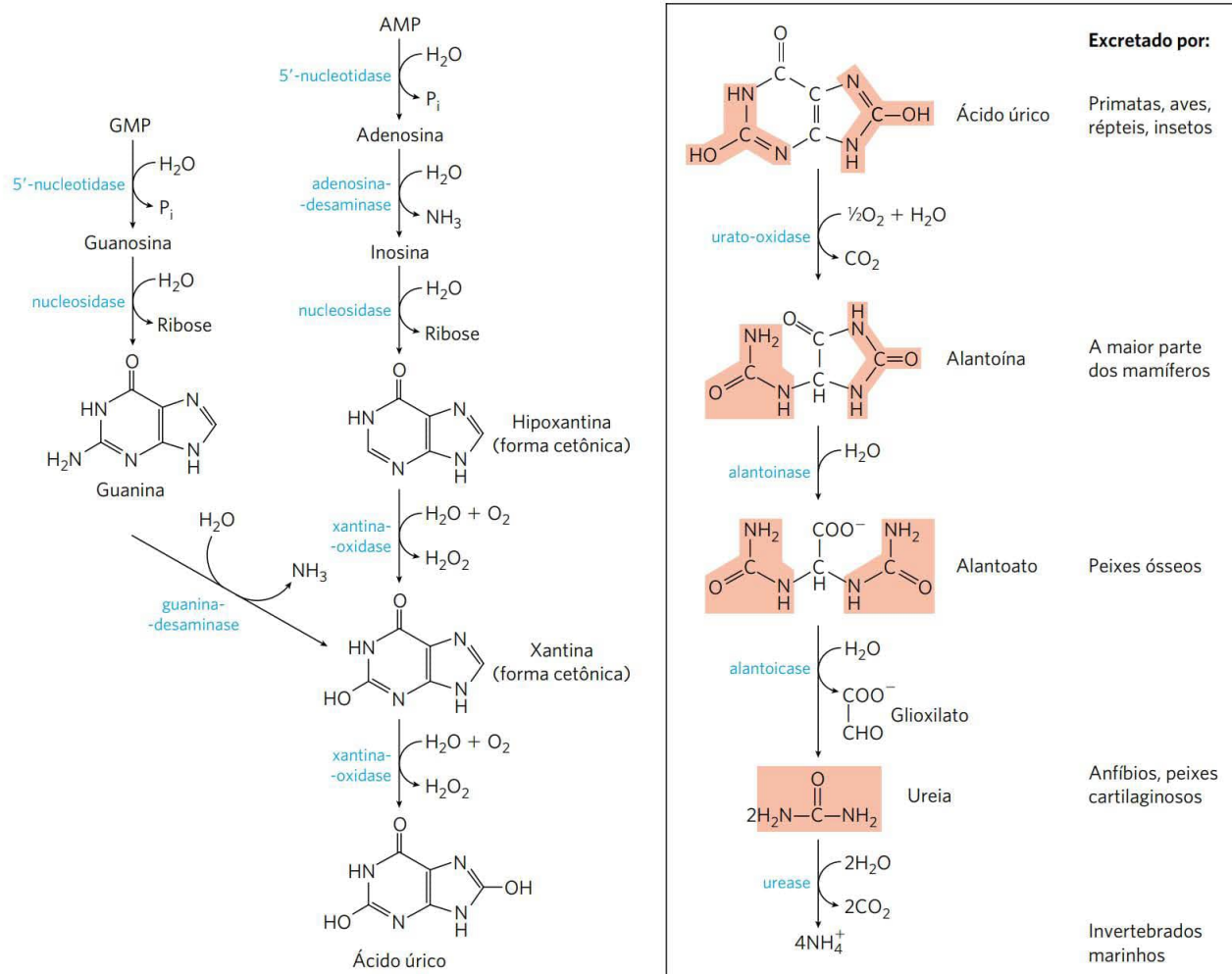


FIGURA 22-48 Catabolismo dos nucleotídeos púricos. Observe que os primatas excretam muito mais nitrogênio na forma de ureia, via ciclo da ureia (Capítulo 18), do que na forma de ácido úrico, produzido na degradação das purinas. Do mesmo modo, os peixes excretam muito mais nitrogênio em forma de NH_4^+ do que em forma de ureia, produzida na via aqui mostrada.

O catabolismo do GMP também produz ácido úrico como produto final. O GMP é inicialmente hidrolisado, originando guanosina, a qual é, então, clivada, liberando guanina livre. A guanina sofre remoção hidrolítica de seu grupo amina, produzindo xantina, que é convertida em ácido úrico pela xantina-oxidase (Figura 22-48).

O ácido úrico é o produto final de excreção do catabolismo das purinas em primatas, aves e em alguns outros animais. Um adulto humano saudável excreta ácido úrico a uma taxa de cerca de 0,6 g/24 h; o produto excretado origina-se, em parte, das purinas ingeridas e, em parte, da renovação dos nucleotídeos púricos dos ácidos nucleicos. Na maioria dos mamíferos e em muitos outros vertebrados, o ácido úrico é ainda degradado até **alantoína** pela ação da **urato-oxidase**. Em outros organismos, a via ainda continua, como mostrado na Figura 22-48.

As vias para a degradação das pirimidinas geralmente levam à produção de NH_4^+ e, assim, à síntese de ureia. A timina, por exemplo, é degradada em semialdeído metilma-

lônico (**Figura 22-49**), um intermediário do catabolismo da valina. Esse composto é, então, degradado, via propionil-CoA e metilmalonil-CoA, gerando, por fim, succinil-CoA (ver Figura 18-27).



Aberrações genéticas do metabolismo das purinas em seres humanos têm sido observadas, algumas com graves consequências. Por exemplo, a **deficiência de adenosina-desaminase (ADA)** leva a uma doença com grave imunodeficiência, na qual os linfócitos T e B não se desenvolvem adequadamente. A falta de ADA leva a um aumento de 100 vezes nas concentrações celulares de dATP, um poderoso inibidor da ribonucleotídeo-reductase (Figura 22-44). Altos níveis de dATP produzem uma deficiência geral de outros dNTP nos linfócitos T. A base para a toxicidade para os linfócitos B está menos esclarecida. Indivíduos com deficiência de ADA não possuem um sistema imune eficaz e não sobrevivem, a menos que sejam tratados. As terapias atuais incluem transplantes de medula óssea de um doador compatível para substituir as células-tronco hematopoietí-

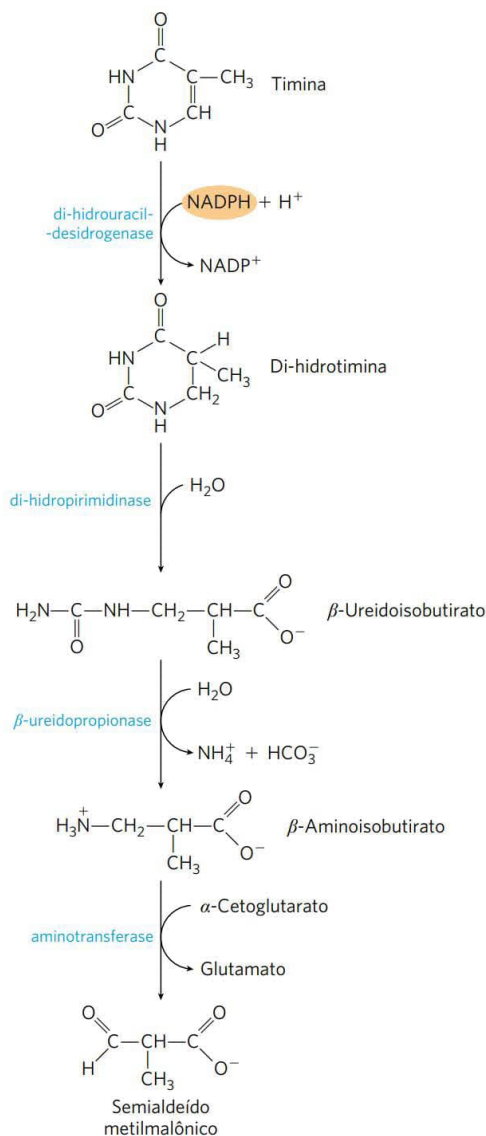
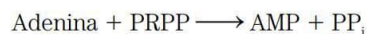


FIGURA 22-49 Catabolismo de uma pirimidina. Aqui está mostrada a via do catabolismo da timina. O semialdeído metilmalônico é posteriormente degradado a succinil-CoA.

cas que amadurecem em linfócitos B e T. No entanto, os transplantados sofrem frequentemente uma variedade de problemas cognitivos e fisiológicos. A terapia de reposição enzimática, que requer injeção intramuscular de ADA ativa uma ou duas vezes por semana, é eficaz, mas o benefício terapêutico geralmente diminui após 8 a 10 anos e surgem complicações, incluindo tumores malignos. Para muitas pessoas, uma cura permanente requer a substituição do gene defeituoso por um funcional nas células da medula óssea. A deficiência de ADA foi um dos primeiros alvos dos ensaios de terapia gênica humana (em 1990). Resultados conflitantes nos ensaios iniciais deram lugar a sucessos significativos, e a terapia gênica está rapidamente se tornando um caminho viável para a restauração da função imune a longo prazo para esses pacientes. ■

Bases púricas e pirimídicas são recicladas por vias de recuperação

As bases púricas e pirimídicas livres são constantemente liberadas nas células durante a degradação metabólica dos nucleotídeos. As purinas livres são, em grande parte, salvas e reutilizadas para sintetizar nucleotídeos, em uma via muito mais simples que a síntese *de novo* dos nucleotídeos púricos, descrita anteriormente. Uma das principais vias de recuperação consiste em uma única reação, catalisada pela **adenosina-fosforribosil-transferase**, na qual uma adenina livre reage com PRPP para produzir o correspondente nucleotídeo da adenina:



Guanina e hipoxantina (produto da desaminação da adenina; Figura 22-48) livres são salvas por essa mesma via, pela **hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase**. Existe uma via de recuperação semelhante para bases pirimídicas em microrganismos e, possivelmente, em mamíferos.



Um defeito genético na atividade da hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase, observado quase exclusivamente em crianças do sexo masculino, resulta no conjunto de sintomas denominado **síndrome de Lesch-Nyhan**. Crianças com essa doença genética, que se manifesta em torno da idade de 2 anos, apresentam, algumas vezes, baixa coordenação motora e deficiência intelectual. Além disso, são extremamente agressivas e mostram tendências à compulsão autodestrutiva: apresentam automutilação, mordendo dedos, artelhos e lábios.

Os efeitos devastadores da síndrome de Lesch-Nyhan ilustram a importância das vias de recuperação. Hipoxantina e guanina surgem constantemente da degradação dos ácidos nucleicos. Na ausência da hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase, os níveis de PRPP aumentam e ocorre uma superprodução de purinas pela via *de novo*, resultando na produção de altos níveis de ácido úrico e lesão tecidual semelhante à da gota (ver a seguir). O cérebro é especialmente dependente das vias de recuperação e isso pode ser a causa da lesão do sistema nervoso em crianças com síndrome de Lesch-Nyhan. Essa síndrome é outro alvo potencial para a terapia gênica. ■

Excesso de ácido úrico causa gota



Durante muito tempo, acreditou-se erroneamente que a gota fosse devida a um “alto padrão de vida”. A gota é uma doença das articulações, causada pela concentração elevada de ácido úrico no sangue e nos tecidos. As articulações tornam-se inflamadas, doloridas e artríticas devido à deposição anormal de cristais de urato de sódio. Os rins também são afetados, pois o ácido úrico em excesso se deposita nos túbulos renais. A gota ocorre predominantemente em pessoas do sexo masculino. Sua causa precisa não é conhecida, mas frequentemente envolve uma excreção reduzida de uratos. A deficiência genética de alguma enzima do metabolismo das purinas também pode ser um fator em alguns casos.

A gota pode ser tratada de maneira eficiente por uma combinação de terapias nutricionais e farmacológicas. Alimentos especialmente ricos em nucleotídeos e ácidos nu-

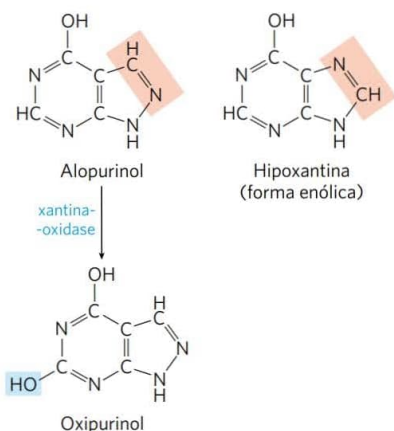
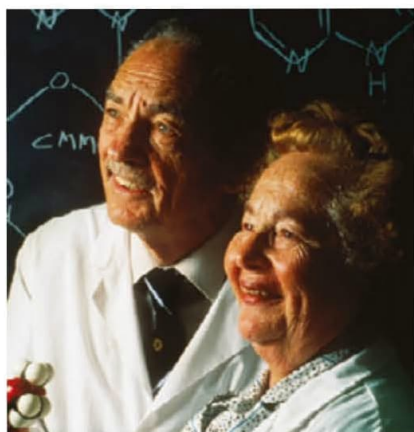


FIGURA 22-50 Alopurinol, inibidor da xantina-oxidase. A hipoxantina é o substrato normal da xantina-oxidase. Apenas uma leve alteração na estrutura da hipoxantina (sombreada em cor salmão) produz um inibidor enzimático clinicamente efetivo, o alopurinol. No sítio ativo, o alopurinol é convertido em oxipurinol, um forte inibidor competitivo, que permanece firmemente ligado à forma reduzida da enzima.

cléicos, como fígado ou produtos glandulares, devem ser excluídos da dieta dos pacientes. Um grande alívio dos sintomas pode ser obtido pela administração de **alopurinol** (Figura 22-50), que inibe a xantina-oxidase, a enzima que catalisa a conversão de purinas em ácido úrico. O alopurinol é um substrato da xantina-oxidase, que o converte em oxipurinol (aloxantina). O oxipurinol inativa a forma reduzida da enzima, permanecendo fortemente ligado ao seu sítio ativo. Quando a xantina-oxidase é inibida, os produtos de excreção do metabolismo das purinas são xantina e hipoxantina, que são mais hidrossolúveis que o ácido úrico e apresentam menor probabilidade de formar depósitos de cristais. O alopurinol foi desenvolvido por Gertrude Elion e George Hitchings, que também desenvolveram o aciclovir, usado no tratamento de pacientes com infecções orais ou genitais por herpes, e outros análogos das purinas utilizados na quimioterapia contra o câncer. ■



George Hitchings, 1905-1998, e Gertrude Elion, 1918-1999. [Fonte: Will e Deni McIntyre/Science Source/Getty Images.]

Muitos agentes quimioterápicos têm como alvo enzimas da via biossintética de nucleotídeos



O crescimento de células cancerosas não é controlado da mesma forma que o crescimento das células na maioria dos tecidos normais. As células cancerosas apresentam maiores necessidades de nucleotídeos, como precursores de DNA e RNA e, em consequência, geralmente são mais sensíveis do que as células normais aos inibidores da biossíntese de nucleotídeos. Um conjunto crescente de agentes quimioterápicos importantes – para o câncer e para outras doenças – atua inibindo uma ou mais enzimas dessas vias. Serão descritos aqui diversos exemplos bem estudados que ilustram abordagens produtivas de tratamento e ajudam a compreender como essas enzimas funcionam.

O primeiro conjunto de agentes inclui compostos que inibem glutamina-amidotransferases. Lembre-se de que a glutamina atua como doador de nitrogênio em pelo menos meia dúzia de reações isoladas da biossíntese de nucleotídeos. Os sítios de ligação para a glutamina e o mecanismo pelo qual o NH_4^+ é extraído são bastante semelhantes em muitas dessas enzimas. A maioria delas são fortemente inibidas por análogos de glutamina, como a **azasserina** e a **acicivina** (Figura 22-51). A azasserina, caracterizada por John Buchanan na década de 1950, foi um dos primeiros exemplos de inativador enzimático com base no mecanismo da reação (inativador suicida; p. 210 e Quadro 6-3). A acicivina parece promissora como agente quimioterápico contra o câncer.

Outros alvos úteis para agentes farmacêuticos são a timidilato-sintase e a di-hidrofolato-redutase, enzimas que fornecem a única via celular para a síntese de timina (Figura 22-52). A **fluorouracila**, um inibidor que atua na síntese de timidilato, é um importante agente quimioterápico. A fluorouracila, por si só, não é um inibidor enzimático. Na célula, vias de recuperação a convertem no desoxinucleosídeo monofosfatado FdUMP, que se liga à enzima, inativando-a. A inibição por FdUMP (Figura 22-53) é um exemplo clássico de inativação enzimática com base no mecanismo da reação. O **metotrexato**, outro exemplo importante de agente quimioterápico, é um inibidor da di-hidrofolato-redutase. Esse análogo do folato atua como inibidor competitivo; a enzima liga-se ao metotrexato com afinidade cerca de 100

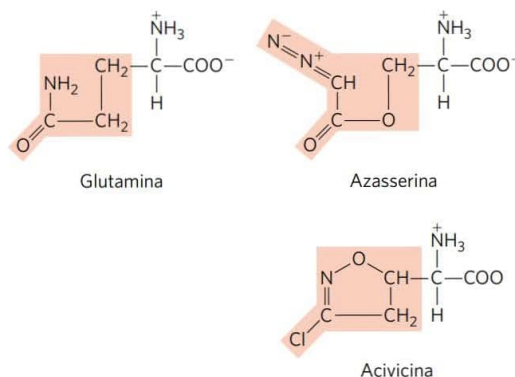


FIGURA 22-51 Azasserina e acicivina, inibidores das glutamina-amidotransferases. Esses análogos da glutamina interferem em diversas vias de biossíntese de aminoácidos e nucleotídeos.

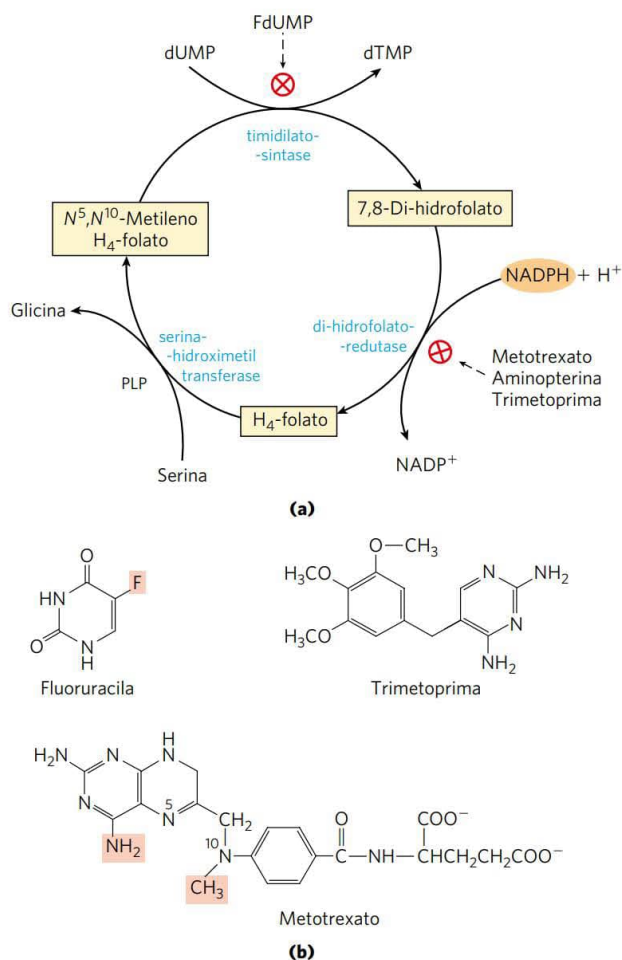
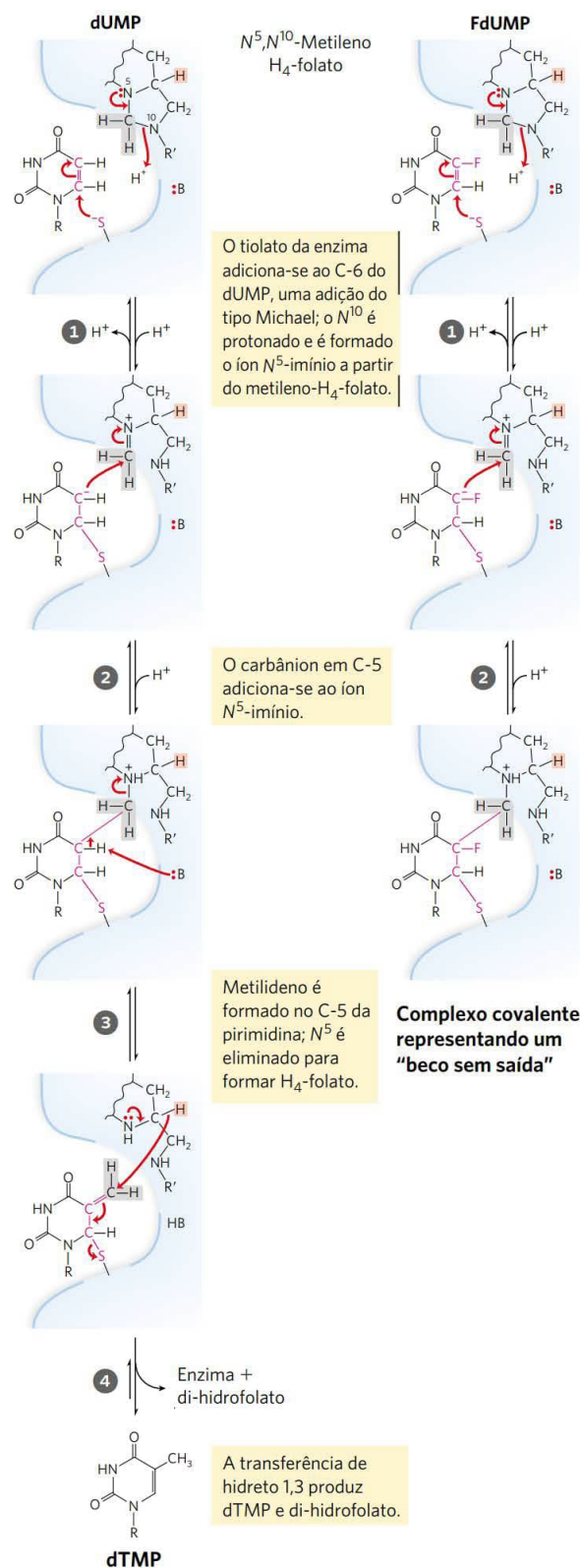


FIGURA 22-52 Síntese de timidilato e metabolismo do folato como alvos para quimioterapia. (a) Durante a síntese de timidilato, N^5, N^{10} -metilenotetra-hidrofolato é convertido em 7,8-di-hidrofolato; o N^5, N^{10} -metilenotetra-hidrofolato é regenerado em dois passos (ver Figura 22-47). Esse ciclo é um alvo importante para diversos agentes quimioterápicos. (b) Fluoruracila e metotrexato são importantes agentes quimioterápicos. Nas células, a fluoruracila é convertida em FdUMP, que inibe a timidilato-sintase. O metotrexato, análogo estrutural do tetra-hidrofolato, inibe a di-hidrofolato-redutase; os grupos amino e metila sombreados substituem um oxigênio carbonílico e um átomo de hidrogênio, respectivamente, no folato (ver Figura 22-47). Outro importante análogo do folato, a aminopterina, é idêntico ao metotrexato, apenas não apresentando o grupo metila sombreado. Trimetoprima, inibidor que se liga firmemente à di-hidrofolato-redutase bacteriana, foi desenvolvido como um antibiótico.

MECANISMO-FIGURA 22-53 Conversão de dUMP em dTMP e sua inibição por FdUMP. O mecanismo normal da reação da timidilato-sintase (à esquerda). O grupo nucleofílico sulfidríla fornecido pela enzima na etapa 1 e os átomos do anel do dUMP que tomam parte na reação são mostrados em vermelho; :B denota a cadeia lateral de um aminoácido que atua como base, para abstrair um próton após a etapa 3. Os hidrogênios derivados do grupo metileno do N^5, N^{10} -metilenotetra-hidrofolato estão sombreados em cinza. A transferência de hidreto 1,3 (etapa 4), move um íon hidreto (sombreado em vermelho-claro) do C-6 do tetra-hidrofolato para o grupo metila da timidina, resultando na oxidação de tetra-hidrofolato em di-hidrofolato. Esta transferência do hidreto é bloqueada quando FdUMP é o substrato (à direita). As etapas 1 e 2 ocorrem normalmente, mas resultam em um complexo estável – consistindo em FdUMP ligado covalentemente à enzima e ao tetra-hidrofolato –, o que inativa a enzima.



vezes maior que ao di-hidrofolato. A **aminopterina** é um composto relacionado, que atua de forma semelhante.

O potencial clínico dos inibidores da biossíntese de nucleotídeos não está limitado ao tratamento do câncer. Todas as células de crescimento rápido (incluindo bactérias e protistas) são potenciais alvos. A **trimetoprima**, um antibiótico desenvolvido por Hitchings e Elion, liga-se à di-hidrofolato-redutase bacteriana com eficiência cerca de 100 mil vezes maior do que à enzima dos mamíferos. É utilizada para tratar certas infecções bacterianas da orelha média e do trato urinário. Os protistas parasitas, como os tripanossomos, que causam a doença do sono africana (tripanossomíase africana), não têm vias para a biossíntese *de novo* de nucleotídeos e são especialmente sensíveis a agentes que interferem em seus processos de captar, do ambiente, nucleotídeos a serem utilizados em vias de recuperação. O alopurinol (Figura 22-50) e diversos análogos semelhantes das purinas têm se mostrado promissores para o tratamento da tripanossomíase africana e de doenças relacionadas. Consulte, no Quadro 6-3, outra abordagem para o combate à tripanossomíase africana, possibilitada pelo avanço em nossa compreensão do metabolismo e dos mecanismos enzimáticos. ■

RESUMO 22.4 Biossíntese e degradação de nucleotídeos

- O sistema de anéis das purinas é construído passo a passo, iniciando com 5-fosforribosilamina. Os aminoácidos glutamina, glicina e aspartato fornecem todos os átomos de nitrogênio das purinas. Os passos de fechamento dos dois anéis formam o núcleo das purinas.
- As pirimidinas são sintetizadas a partir de carbamoil-fosfato e de aspartato, e a ribose-5-fosfato é, então, ligada para produzir ribonucleotídeos pirimídicos.
- Os nucleosídeos monofosfatados são convertidos em seus derivados trifosfatados por reações enzimáticas de fosforilação. Os ribonucleotídeos são convertidos em desoxirribonucleotídeos pela ribonucleotídeo-redutase, uma enzima com novas características mecânicas e reguladoras. Os nucleotídeos da timina são derivados de dCDP e dUMP.
- O ácido úrico e a ureia são produtos finais da degradação de purinas e pirimidinas.
- As purinas livres podem ser usadas em vias de recuperação, na reconstrução de nucleotídeos. Deficiências genéticas em certas enzimas das vias de recuperação causam doenças graves, como a síndrome de Lesch-Nyhan e a deficiência de ADA.
- O acúmulo de cristais de ácido úrico nas articulações, possivelmente causado por outra deficiência genética, resulta na gota.
- As enzimas das vias de biossíntese de nucleotídeos são alvos de um conjunto de agentes quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer e de outras doenças.

Termos-chave

Termos em negrito estão definidos no glossário.

ciclo do nitrogênio 860 **anamox** 860
fixação do nitrogênio 860 **simbiontes** 861

complexo da nitrogenase 861
 grupo P 861
 cofator FeMo 861
 leg-hemoglobina 865
 glutamina-sintetase 866
 glutamato-sintase 866
 glutamina-amidotransferases 868
 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP) 870
 triptofano-sintase 876
porfirina 880
porfíria 882
 bilirrubina 882
 fosfocreatina 884
 creatina 884
 glutatona (GSH) 885
auxina 886
 dopamina 887
 noradrenalina 887
 adrenalina 887
 γ -aminobutirato (GABA) 887
 serotonina 887
 histamina 897
 cimetidina 887
 espermina 887
 espermidina 887

ornitina-descarboxilase 887
via de novo 888
via de recuperação 888
 inosinato (IMP) 890
 carbamoil-fosfato-sintetase II 893
 aspartato-transcarbamoylase 893
nucleosídeo-monofosfato-cinase 894
nucleosídeo-difosfato-cinase 894
 ribonucleotídeo-redutase 895
 tioredoxina 895
 timidilato-sintase 898
 di-hidrofolato-redutase 898
 deficiência de adenosina-desaminase (ADA) 899
 síndrome de Lesch-Nyhan 900
 alopurinol 901
 azasserina 901
 acivicina 901
 fluoruracila 901
 metotrexato 901
 aminopterina 903

Teste seu conhecimento

1. Consumo de ATP nos nódulos das raízes de leguminosas As bactérias que residem nos nódulos das raízes de ervilhas consomem mais de 20% do ATP produzido pela planta. Sugira uma razão para esse alto consumo de ATP.

2. Glutamato-desidrogenase e síntese proteica A bactéria *Methylophilus methylotrophus* pode sintetizar proteína a partir de metanol e amônia. Técnicas utilizando DNA recombinante melhoraram o rendimento da produção de proteínas pela introdução do gene da glutamato-desidrogenase de *E. coli* em *M. methylotrophus*. Por que essa manipulação genética aumenta o rendimento proteico?

3. Mecanismos de reações utilizando PLP O piridoxal-fosfato pode ajudar a catalisar transformações envolvendo carbonos nas posições 1 ou 2 a partir do carbono α de um aminoácido. A enzima treonina-sintase (ver Figura 22-17) promove a conversão dependente de PLP de fosfo-homosserina em treonina. Sugira um mecanismo para essa reação.

4. Transformação de aspartato em asparagina Há duas vias para a transformação de aspartato em asparagina, à custa de ATP. Muitas bactérias têm uma asparagina-sintetase que utiliza íons amônio como fonte de nitrogênio. Os mamíferos têm uma asparagina-sintetase que utiliza a glutamina como doador de nitrogênio. Uma vez que esse último processo requer um ATP extra (para a síntese de glutamina), por que os mamíferos utilizam essa via?

5. Equação para a síntese de aspartato a partir de glicose Escreva a equação global para a síntese de aspartato (aminoácido não essencial) a partir de glicose, dióxido de carbono e amônia.



6. Inibidores da asparagina-sintetase na terapia contra a leucemia A asparagina-sintetase dos mamíferos é uma amidotransferase dependente de glutamina. Esforços para a identificação de um inibidor efetivo da asparagina-sintetase humana para utilização como quimioterápico em pacientes com leucemia têm sido focalizados na porção carboxiterminal, onde se localiza o sítio ativo da sintetase, e não no domínio glutaminase, na porção aminoterminal. Explique por que o domínio glutaminase não é um alvo promissor para um medicamento eficaz.

7. Deficiência de fenilalanina-hidroxilase e dieta A tirosina normalmente é um aminoácido não essencial, mas pessoas com defeito genético na fenilalanina-hidroxilase necessitam de tirosina em sua dieta para um crescimento normal. Explique.

8. Cofatores em reações de transferência de um carbono A maioria das transferências de grupos de um carbono é promovida por um desses três cofatores: biotina, tetra-hidrofolato ou *S*-adenosilmetionina (Capítulo 18). A *S*-adenosilmetionina geralmente é utilizada como doador de grupos metil; o potencial de transferência do grupo metila no *N*⁵-metiltetra-hidrofolato é insuficiente para a maioria das reações biossintéticas. Contudo, um exemplo de utilização de *N*⁵-metiltetra-hidrofolato para a transferência do grupo metila ocorre na formação de metionina, catalisada pela metionina-sintase (etapa ⑤ na Figura 22-17); a metionina é o precursor imediato da *S*-adenosilmetionina (ver Figura 18-18). Explique como o grupo metila da *S*-adenosilmetionina pode ser obtido a partir do *N*⁵-metiltetra-hidrofolato, embora o potencial de transferência do grupo metila no *N*⁵-metiltetra-hidrofolato seja um milésimo daquele do grupo metila na *S*-adenosilmetionina.

9. Regulação orquestrada na biossíntese de aminoácidos A glutamina-sintetase de *E. coli* é modulada independentemente por vários produtos do metabolismo da glutamina (ver Figura 22-8). Nessa inibição concertada, o grau de inibição enzimática é maior que a soma dos efeitos inibidores causados pelos produtos separadamente. Para o crescimento da *E. coli* em um meio rico em histidina, qual seria a vantagem da inibição concertada?



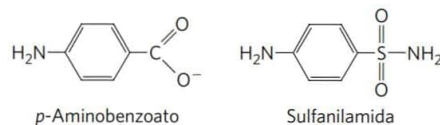
10. Relação entre deficiência de ácido fólico e anemia A deficiência de ácido fólico, que se acredita ser a deficiência vitamínica mais comum, causa um tipo de anemia em que a síntese de hemoglobina está prejudicada e os eritrócitos não amadurecem adequadamente. Qual a relação metabólica entre a síntese de hemoglobina e a deficiência de ácido fólico?

11. Biossíntese de nucleotídeos em bactérias auxotróficas para aminoácidos Células de *E. coli* do tipo selvagem podem sintetizar todos os 20 aminoácidos comuns. Contudo, alguns mutantes, chamados de auxotróficos para aminoácidos, são incapazes de sintetizar um determinado aminoácido e necessitam da adição dele ao meio de cultura para um crescimento ótimo. Além de seu papel na síntese proteica, alguns aminoácidos são também precursores de outros produtos nitrogenados na célula. Considere três auxotróficos para aminoácidos, que são incapazes de sintetizar glicina, glutamina e aspartato, respectivamente. Para cada mutante, quais produtos nitrogenados a célula deixaria de sintetizar, além das proteínas?

12. Inibidores da biossíntese de nucleotídeos Sugira mecanismos para a inibição da (a) alanina-racemase por L-fluoralanina e da (b) glutamina-amidotransferase pela azaserina.



13. Mecanismo de ação das sulfas Algumas bactérias necessitam de *p*-aminobenzoato no meio de cultura para um crescimento normal, e seu crescimento é gravemente inibido pela adição de sulfanilamida, uma das primeiras sulfas utilizadas. Além disso, na presença desse fármaco, ocorre acúmulo de 5-aminoimidazol-4-carboxamida-ribonucleotídeo no meio de cultura (AICAR; ver Figura 22-35). Esses efeitos são revertidos pela adição de excesso de *p*-aminobenzoato.



- Qual é a função do *p*-aminobenzoato nessas bactérias? (Dica: ver Figura 18-16.)
- Por que o AICAR se acumula na presença de sulfanilamida?
- Por que a inibição e o acúmulo são revertidos pela adição de excesso de *p*-aminobenzoato?

14. Via para os carbonos na biossíntese de pirimidinas Determine os locais, na molécula do orotato, onde será encontrado ¹⁴C, quando esse composto é isolado de células crescidas em meio contendo uma pequena quantidade de [¹⁴C]succinato uniformemente marcado. Justifique sua resposta.

15. Nucleotídeos como fontes pobres para a obtenção de energia Em condições de falta de alimento, os organismos podem utilizar proteínas e aminoácidos como fonte de energia. A desaminação dos aminoácidos produz esqueletos de carbono que podem entrar na via glicolítica e no ciclo do ácido cítrico, produzindo energia na forma de ATP. Os nucleotídeos não são degradados da mesma forma para uso como combustíveis produtores de energia. Quais observações da fisiologia celular apoiam essa afirmação? Quais aspectos da estrutura dos nucleotídeos os tornam uma fonte relativamente pobre de energia?



16. Tratamento da gota O alopurinol (ver Figura 22-50), inibidor da xantina-oxidase, é utilizado para o tratamento da gota crônica. Explique a base bioquímica para esse tratamento. Pacientes tratados com alopurinol algumas vezes desenvolvem cálculos de xantina nos rins, embora a incidência de dano renal seja muito menor que na gota não tratada. Explique essa observação, considerando as solubilidades desses compostos na urina: ácido úrico, 0,15 g/L; xantina, 0,05 g/L; e hipoxantina, 1,4 g/L.

17. Inibição da síntese de nucleotídeos pela azaserina O composto diazo *O*-(2-diazoacetil)-L-serina, também conhecido como azaserina (ver Figura 22-51), é um poderoso inibidor das glutamina-amidotransferases. Se células em crescimento são tratadas com azaserina, quais intermediários da biossíntese de nucleotídeos se acumulam? Explique.

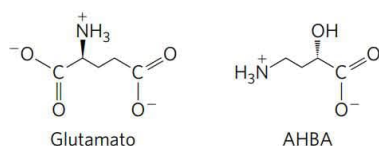
Problema de análise de dados

18. Utilização de técnicas moleculares modernas na determinação da via biossintética de um novo aminoácido A maior parte das vias biossintéticas descritas neste capítulo foi determinada antes do desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante e da genômica, de modo que as técnicas

eram bastante diferentes daquelas que os pesquisadores utilizariam hoje. Aqui, é fornecido um exemplo de utilização de técnicas moleculares modernas para investigar a via de síntese de um novo aminoácido, (2*S*)-4-amino-2-hidroxibutirato (AHBA). As técnicas aqui mencionadas estão descritas em várias seções deste livro; este problema foi delineado para mostrar como essas técnicas podem ser integradas em um estudo abrangente.

O AHBA é um γ -aminoácido, componente de alguns antibióticos aminoglicosídicos, incluindo o antibiótico butirosina. Os antibióticos modificados pela adição de um resíduo de AHBA, com frequência, são mais resistentes à inativação por enzimas bacterianas de resistência a antibióticos. Como resultado, a compreensão de como o AHBA é sintetizado e adicionado a antibióticos é útil para o planejamento de medicamentos.

Em um artigo publicado em 2005, Li e colaboradores descrevem como determinaram a via de síntese do AHBA a partir do glutamato.



- (a) Descreva de modo sucinto as transformações químicas necessárias para converter glutamato em AHBA. Neste ponto, não se preocupe com a *sequência* das reações.

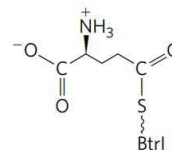
Li e colaboradores começaram clonando o grupo de genes responsáveis pela biossíntese de butirosina na bactéria *Bacillus circulans*, que produz grandes quantidades desse antibiótico. Eles identificaram cinco genes essenciais para a via: *btrI*, *btrJ*, *btrK*, *btrO* e *btrV*. Os pesquisadores, então, clonaram esses genes em plasmídeos de *E. coli*, o que permite a superexpressão dos genes, produzindo proteínas com “etiquetas de histidina” fundidas a seus aminoterminais para facilitar a purificação (ver p. 332).

A sequência de aminoácidos prevista para a proteína BtrI mostrou forte homologia com proteínas carreadoras de acila (ver Figura 21-5). Utilizando espectrometria de massas, Li e colaboradores encontraram uma massa molecular de 11.812 para a proteína BtrI purificada (incluindo a etiqueta de His). Quando a proteína BtrI purificada foi incubada com coenzima A e com uma enzima capaz de ligar CoA a outras proteínas carreadoras de acilas, a espécie molecular principal apresentou M_r de 12.153.

- (b) Como você utilizaria esses dados para argumentar que a BtrI pode atuar como proteína carreadora de acilas com uma CoA como grupo prostético?

Utilizando a terminologia-padrão, Li e colaboradores chamaram de apo-BtrI a forma da proteína não ligada à CoA, e a forma com a CoA (ligada como na Figura 21-5) foi denominada holo-BtrI. Quando a holo-BtrI foi incubada

com glutamina, ATP e proteína BtrJ purificada, a espécie holo-BtrI de M_r de 12.153 foi substituída por uma espécie de M_r de 12.281, correspondendo ao tioéster de glutamato com holo-BtrI. Com base nesses dados, os autores propuseram a seguinte estrutura para a espécie de M_r de 12.281 (γ -glutamyl-S-BtrI):



- (c) Que outra(s) estrutura(s) é(são) consistente(s) com esses dados?
- (d) Li e colaboradores argumentaram que a estrutura aqui mostrada (γ -glutamyl-S-BtrI) provavelmente seja a correta, pois o grupo α -carboxila deve ser removido em algum momento do processo biossintético. Explique a base química para esse argumento. (Dica: ver Figura 18-6, reação C.)

A proteína BtrK mostrou significativa homologia com aminoácido-descarboxilases dependentes de PLP, e descobriu-se que a BtrK isolada de *E. coli* continha PLP fortemente ligado. Quando γ -glutamyl-S-BtrI foi incubada com BtrK purificada, foi produzida uma espécie molecular com M_r de 12.240.

- (e) Qual a estrutura mais provável para essa espécie?
- (f) De modo curioso, quando os investigadores incubaram glutamato e ATP com BtrI, BtrJ e BtrK purificadas, eles observaram a produção de uma espécie molecular com M_r de 12.370. Qual a estrutura mais provável para essa espécie? Dica: lembre-se de que BtrJ pode usar ATP para grupos nucleofílicos de γ -glutamato.

Li e colaboradores descobriram que a BtrO é homóloga a enzimas do tipo monooxigenase (ver Quadro 21-1), que hidroxilam alcanos, utilizando FMN como cofator, e que a BtrV é homóloga a uma NAD(P)H-oxidoreductase. Dois outros genes nesse núcleo, *btrG* e *btrH*, provavelmente codifiquem enzimas que removem o grupo γ -glutamila e ligam AHBA à molécula do antibiótico-alvo.

- (g) Com base nesses dados, proponha uma via plausível para a síntese de AHBA e sua ligação ao antibiótico-alvo. Inclua as enzimas que catalisam cada passo e quaisquer outros substratos ou cofatores necessários (ATP, NAD, etc.).

Referência

Li, Y., N.M. Llewellyn, R. Giri, F. Huang e J.B. Spencer. 2005. Biosynthesis of the unique amino acid side chain of butirosin: possible protective-group chemistry in an acyl carrier protein-mediated pathway. *Chem. Biol.* 12:665–675.

Esta página foi deixada em branco intencionalmente.

Regulação hormonal e integração do metabolismo em mamíferos

- 23.1 Hormônios: estruturas diferentes para funções diferentes 907
- 23.2 Metabolismo específico para cada tecido: a divisão de trabalho 918
- 23.3 Regulação hormonal do metabolismo energético 930
- 23.4 Obesidade e regulação da massa corporal 939
- 23.5 Obesidade, síndrome metabólica e diabetes tipo 2 949

Nos Capítulos 13 a 22 foi discutido o metabolismo nas células individuais, enfatizando as vias centrais comuns a quase todas as células – bacterianas, arqueobacterianas e eucarióticas. Foi analisado como os processos metabólicos dentro das células são regulados nas reações enzimáticas individuais pela disponibilidade de substrato, por mecanismos alostéricos e por fosforilação ou outra modificação covalente das enzimas.

Para entender completamente o significado das vias metabólicas individuais e sua regulação, é necessário observar essas vias no contexto do organismo como um todo. Uma característica essencial dos organismos multicelulares é a diferenciação celular e a divisão de trabalho. As funções especializadas dos tecidos e dos órgãos de organismos complexos, como os seres humanos, impõem requerimentos energéticos característicos e padrões de metabolismo. Sinais hormonais e neuronais integram e coordenam as atividades metabólicas de diferentes tecidos e otimizam a alocação de combustíveis e precursores para cada órgão.

Este capítulo terá como foco os mamíferos, detendo-se no metabolismo especializado de vários órgãos e tecidos importantes e na integração do metabolismo em todo o organismo. Inicia-se com uma análise do amplo alcance dos hormônios e dos mecanismos hormonais, e, em seguida, serão apresentadas as funções específicas de tecidos diferentes reguladas por esses mecanismos. Em seguida, será discutida a distribuição de nutrientes para vários órgãos, enfatizando o papel central do fígado e a cooperação metabólica entre esses órgãos. Para ilustrar o papel integrador dos hormônios, será descrita a inter-relação entre a insulina, o glucagon e a adrenalina na coordenação do metabolismo energético no músculo, no fígado e no tecido adiposo. Outros hormônios, produzidos no tecido adiposo, músculo, intesti-

no e cérebro, também desempenham papéis fundamentais na coordenação do metabolismo e do comportamento. Será discutida a regulação hormonal a longo prazo da massa corporal e, finalmente, o papel da obesidade no desenvolvimento da síndrome metabólica e do diabetes tipo 2.

23.1 Hormônios: estruturas diferentes para funções diferentes

Os **hormônios** são pequenas moléculas ou proteínas produzidas em um tecido, liberadas na circulação e transportadas a outros tecidos, nos quais agem por meio de receptores para produzir mudanças nas atividades celulares. Também estão incluídos nesta discussão sinais de curta duração, como o NO, que atua localmente, em células vizinhas. Os hormônios servem para coordenar as atividades metabólicas de vários tecidos ou órgãos. Em um organismo complexo, praticamente cada processo é regulado por um ou mais hormônios: manutenção da pressão sanguínea, do volume sanguíneo e do equilíbrio de eletrólitos; embriogênese; diferenciação sexual, desenvolvimento e reprodução; fome, comportamento alimentar, digestão e distribuição de combustíveis – para citar apenas alguns. Esta seção examinará os métodos de detecção e de medida de hormônios e sua interação com receptores, usando uma seleção representativa de tipos de hormônios.

A coordenação do metabolismo nos mamíferos é realizada pelo **sistema neuroendócrino**. As células de um determinado tecido sentem uma mudança nas condições do organismo e respondem, secretando um mensageiro químico, que passa para outra célula no mesmo tecido ou em um tecido diferente, na qual o mensageiro se liga a uma molécula receptora e desencadeia uma mudança nesta segunda célula. Esses mensageiros químicos podem transmitir informação a distâncias muito curtas ou muito longas. Na sinalização neuronal (**Figura 23-1a**), o mensageiro químico é um neurotransmissor (p. ex., acetilcolina) e percorre somente uma fração de micrômetro através da fenda sináptica até o neurônio seguinte em uma rede. Na sinalização hormonal, os mensageiros – hormônios – são transportados pela corrente sanguínea para células vizinhas ou para órgãos e tecidos distantes; eles podem percorrer um metro ou mais para encontrar suas células-alvo (**Figura 23-1b**). Exce-

to por essa diferença anatômica, esses dois mecanismos de sinalização química são muito semelhantes, e a mesma molécula pode, às vezes, agir como neurotransmissor e como hormônio. A adrenalina e a noradrenalina, por exemplo, servem como neurotransmissores em determinadas sinapses do cérebro e nas junções neuromusculares do músculo liso, e como hormônios que regulam o metabolismo energético no fígado e no músculo. A discussão que se segue sobre a sinalização celular enfatiza a ação hormonal, esboçada nas discussões sobre metabolismo energético nos capítulos anteriores, porém a maioria dos mecanismos fundamentais aqui descritos também ocorre na ação neurotransmissora.

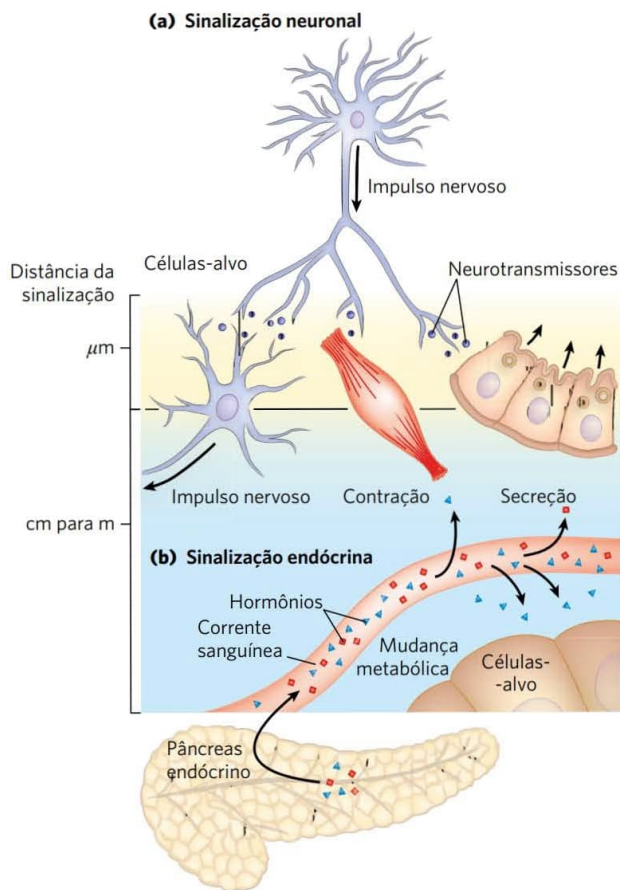


FIGURA 23-1 Sinalização pelo sistema neuroendócrino. (a) Na sinalização neuronal, sinais elétricos (impulsos nervosos) originam-se no corpo celular de um neurônio e se propagam muito rapidamente por longas distâncias até a extremidade do axônio, onde os neurotransmissores são liberados e se difundem para a célula-alvo. A célula-alvo (outro neurônio, um miócito ou uma célula secretora) está a uma distância de apenas uma fração de micrômetro ou poucos micrômetros do local de liberação do neurotransmissor. (b) Na sinalização endócrina, os hormônios (como insulina produzida nas células β -pancreáticas) são secretados para a corrente sanguínea, que os transporta pelo corpo até os tecidos-alvo, que podem estar a uma distância de um metro ou mais da célula secretora. Tanto os neurotransmissores quanto os hormônios interagem com receptores específicos na superfície ou no interior de suas células-alvo, desencadeando as respostas.

A detecção e a purificação dos hormônios requerem um ensaio biológico

Como é detectado e isolado um hormônio? Em primeiro lugar, os pesquisadores descobrem que um processo fisiológico em um tecido depende de um sinal que tem origem em outro tecido. A insulina, por exemplo, primeiramente foi reconhecida como substância produzida no pâncreas e que afeta a concentração da glicose no sangue e na urina (Quadro 23-1). Uma vez descoberto o efeito fisiológico do suposto hormônio, foi possível desenvolver um ensaio biológico quantitativo para ele. No caso da insulina, o ensaio consistiu na injeção de extratos de pâncreas (fonte bruta de insulina) em animais experimentais deficientes em insulina, quantificando-se, então, as alterações na concentração de glicose no sangue e na urina. Para isolar um hormônio, o bioquímico fraciona os extratos que contêm o suposto hormônio com as mesmas técnicas usadas para purificar outras biomoléculas (fracionamento com solvente, cromatografia e eletroforese), testando cada fração quanto à atividade hormonal. Uma vez purificado, sua composição e estrutura podem ser determinadas.

Esse protocolo para caracterização hormonal é ilusoriamente simples. Os hormônios são extremamente potentes e são produzidos em quantidades muito pequenas. A obtenção de quantidades suficientes de um hormônio para permitir sua caracterização química geralmente requer isolamentos bioquímicos em uma escala heroica. Quando Andrew Schally e Roger Guillemin, de modo independente, purificaram e caracterizaram o hormônio liberador de tirotrofina (TRH, do inglês, *thyrotropin-releasing hormone*) do hipotálamo, o grupo de Schally utilizou cerca de 20 toneladas de hipotálamos de aproximadamente 2 milhões de ovelhas e o grupo de Guillemin extraiu hipotálamos de cerca de 1 milhão de porcos. O TRH foi identificado como um derivado simples do tripeptídeo Glu-His-Pro (**Figura 23-2**). Uma vez conhecida a estrutura, esse hormônio pode ser sintetizado quimicamente em grandes quantidades para uso nos estudos fisiológicos e bioquímicos. Por seus trabalhos com os hormônios hipotalâmicos, Schally e Guillemin receberam, em 1977, o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina, juntamente com Rosalyn Yalow, que, com Solomon A. Berson, desenvolveu o **radioimunoensaio (RIE)**, um ensaio extremamente sensível para a detecção de hormônios peptídicos, e o utilizou para estudar a ação hormonal. Essa técnica revolucionou a pesquisa de hormônios ao possibilitar a medição rápida, quantitativa e específica de hormônios em quantidades mínimas.

Os anticorpos específicos de hormônios são a chave para o RIE e seu equivalente moderno, o **ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (ELISA)** (ver Figura 5-26b). O hormônio purificado, injetado em coelhos, camundongos ou galinhas, induz anticorpos que se ligam ao hormônio com alta afinidade e especificidade. Esses anticorpos podem ser purificados e marcados com radioisótopos (para RIE) ou conjugados com uma enzima que gera um produto colorido (para ELISA). Os anticorpos marcados interagem com extratos contendo o hormônio. A fração do anticorpo que se liga ao hormônio no extrato é quantificada pela detecção

QUADRO 23-1



MEDICINA

Como é descoberto um hormônio? O caminho árduo até a insulina purificada

Milhões de pessoas com diabetes melito tipo 1 injetam diariamente em si mesmas insulina pura, para compensar a falta de produção desse hormônio essencial por suas próprias células β -pancreáticas. A injeção de insulina não é a cura para o diabetes, mas permite uma vida longa e produtiva a pessoas que, de outra forma, morreriam jovens. A descoberta da insulina, que começou com uma observação accidental, ilustra a combinação de serendipidade e experimentação cuidadosa que levou à descoberta de muitos hormônios.

Em 1889, Oskar Minkowski, jovem assistente na Faculdade de Medicina de Estrasburgo, e Josef von Mering, do Instituto Hoppe-Seyler, também em Estrasburgo, tiveram uma discussão amigável sobre a importância do pâncreas, conhecido por conter lipases, na digestão de gorduras em cães. Para resolver a questão, eles começaram um experimento sobre a digestão das gorduras. Eles removeram cirurgicamente o pâncreas de um cão, porém, antes que o experimento prosseguisse, Minkowski observou que o cão agora estava produzindo muito mais urina do que em condições normais (sintoma comum do diabetes não tratado). Além disso, a urina continha níveis de glicose acima do normal (outro sintoma de diabetes). Esses resultados sugeriram que a falta de algum produto pancreático causaria o diabetes.

Minkowski tentou, sem sucesso, preparar um extrato de pâncreas de cão que pudesse reverter o efeito da remoção do órgão – isto é, baixar os níveis de glicose no sangue e na urina. Hoje, sabe-se que a insulina é uma proteína e que o pâncreas é muito rico em proteases (tripsina e quimotripsina), normalmente liberadas no intestino delgado para auxiliar na digestão. Sem dúvida, essas proteases degradavam a insulina nos extratos pancreáticos dos experimentos de Minkowski.

Apesar de esforços consideráveis, nenhum progresso significativo foi obtido no isolamento ou na caracterização do “fator antidiabético” até o verão de 1921, quando Frederick G. Banting, jovem cientista trabalhando no laboratório de J. J. R. MacLeod, na Universidade de Toronto, e um estudante assistente, Charles Best, dedicaram-se ao problema. Nessa época, várias evidências apontavam para um grupo de células especializadas no pâncreas (as ilhotas de Langerhans; ver Figura 23-27) como a fonte do fator antidiabético, o qual viria a ser chamado de insulina (do latim, *insula*, “ilha”).

Tomando precauções para impedir a proteólise, Banting e Best (mais tarde auxiliados pelo bioquímico J. B. Collip) conseguiram, em dezembro de 1921, preparar um extrato pancreático purificado que curava os sintomas do diabetes experimental em cães. Em 25 de janeiro de 1922 (somente um mês mais tarde), sua preparação de insulina foi injetada em Leonard Thompson, um menino de 14 anos gravemente doente com diabetes melito. Em poucos dias, os níveis de corpos cetô-

nicos e de glicose na urina de Thompson diminuíram drasticamente; o extrato salvou sua vida e a vida de muitas crianças seriamente doentes que também receberam essas preparações (Figura Q-1). Em 1923, Banting e MacLeod receberam o Prêmio Nobel pelo isolamento da insulina. Banting anunciou imediatamente que dividiria seu prêmio com Best; MacLeod dividiu o seu com Collip.

Já em 1923, as companhias farmacêuticas forneciam insulina extraída de pâncreas de porco a milhares de pacientes ao redor do mundo. Com o desenvolvimento das técnicas de engenharia genética, na década de 1980, tornou-se possível produzir quantidades ilimitadas de insulina humana pela inserção do gene clonado da insulina humana em um microrganismo, o qual foi, então, cultivado em escala industrial. Alguns pacientes com diabetes estão usando bombas de insulina implantadas, as quais liberam quantidades ajustáveis do hormônio para satisfazer às necessidades no horário das refeições e durante o exercício. Existe uma perspectiva razoável de que, no futuro, o tecido pancreático transplantado fornecerá uma fonte de insulina que responda tão bem quanto um pâncreas normal, liberando insulina na corrente sanguínea somente quando a glicemia aumentar.

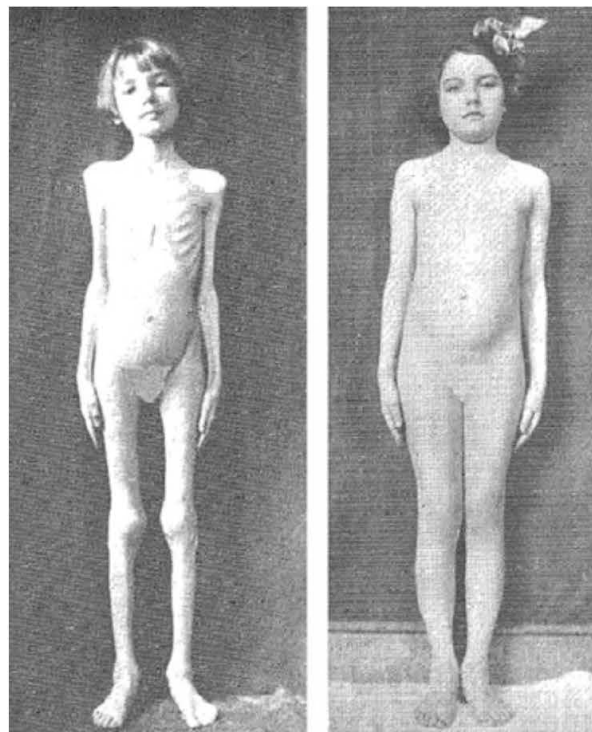


FIGURA Q-1 Criança com diabetes tipo 1 antes (à esquerda) e após (à direita) 3 meses de tratamento com uma preparação de insulina. [Fonte: H. R. Geyelin et al., *J. Metabol. Res.* 2:767, 1922.]

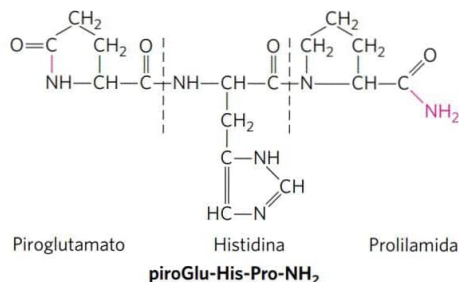


FIGURA 23-2 Estrutura do hormônio liberador de tireotrofina (TRH).

Purificado (após esforços heroicos) de extratos de hipotálamo, o TRH é um derivado do tripeptídeo Glu-His-Pro. O grupo carboxílico da cadeia lateral do Glu aminoterminal forma uma amida (ligação em vermelho) com o grupo α -amino desse resíduo, criando o piroglutamato, e o grupo carboxílico da Pro carboxiterminal é convertido em uma amida (NH₂ em vermelho). Essas modificações são comuns entre os hormônios peptídicos pequenos. Em uma proteína típica de aproximadamente M_r 50.000, as mudanças nos grupos amina e carboxiterminais contribuem muito pouco para a carga total da molécula, porém, em um tripeptídeo, as duas cargas dominam as propriedades da molécula. A formação de derivados amida remove essas cargas.

da radiação ou por fotometria. Devido à alta afinidade do anticorpo pelo hormônio, esses ensaios podem ser sensíveis a picogramas de hormônio em uma amostra.

Os hormônios atuam por meio de receptores celulares específicos de alta afinidade

Conforme foi visto no Capítulo 12, todos os hormônios agem por meio de receptores altamente específicos nas células-alvo sensíveis a eles, e os hormônios se ligam a esses receptores com alta afinidade. Cada tipo celular tem sua própria combinação de receptores hormonais, os quais definem o espectro da capacidade de resposta da célula aos hormônios. Além disso, dois tipos celulares com o mesmo tipo de receptor podem ter diferentes alvos intracelulares da ação hormonal e, assim, podem responder de modo diferente ao mesmo hormônio. A especificidade da ação hormonal resulta da complementaridade estrutural entre o hormônio e seu receptor; essa interação é extremamente seletiva, de modo que até mesmo hormônios estruturalmente semelhantes podem ter efeitos diferentes se se ligarem preferencialmente a receptores diferentes. A alta afinidade da interação permite às células responder a concentrações muito baixas do hormônio. No delineamento de fármacos planejados para intervir na regulação hormonal, é preciso conhecer a especificidade relativa e a afinidade do fármaco e do hormônio natural.

As consequências intracelulares das interações ligante-receptor são de, pelo menos, quatro tipos: (1) um segundo mensageiro, como o cAMP, o cGMP ou o inositol-trisfosfato, gerado no interior da célula atua como um regulador alostérico de uma ou mais enzimas; (2) um receptor de tirosina-cinase é ativado pelo hormônio extracelular; (3) uma alteração no potencial de membrana, resultando na abertura ou no fechamento de um canal iônico controlado por hormônio; e (4) um esteroide ou uma molécula tipo esteroide cau-

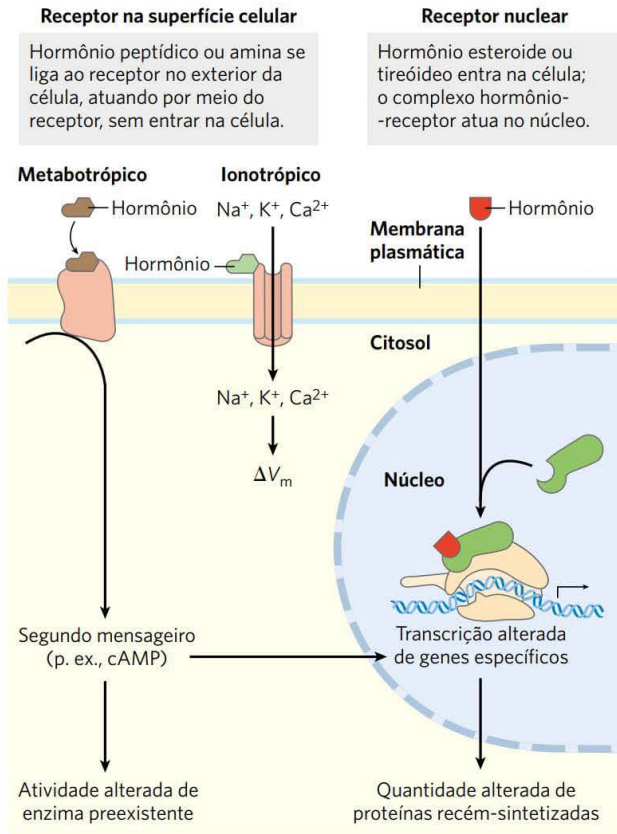
sa uma alteração no nível de expressão (transcrição do DNA em mRNA) de um ou mais genes, mediada por uma proteína receptora de hormônio nuclear (Figura 12-2).

Os peptídeos solúveis em água e os hormônios aminos, como a insulina e a adrenalina, atuam extracelularmente pela sua ligação aos receptores da superfície celular, localizados ao longo da membrana plasmática (Figura 23-3). Quando o hormônio se liga ao domínio extracelular do receptor, ele sofre uma mudança de conformação análoga à produzida em uma enzima alostérica pela ligação de uma molécula efetora. A mudança conformacional desencadeia o efeito do hormônio. Com receptores **metabotrópicos**, a mudança ativa ou inibe uma enzima a jusante do receptor; com receptores **ionotrópicos**, um canal iônico na membrana plasmática abre ou fecha, resultando em uma mudança no potencial de membrana (ΔV_m) ou na concentração de determinado íon, como o Ca^{2+} .

Uma única molécula de hormônio, na formação do complexo hormônio-receptor, ativa um catalisador que produz muitas moléculas de segundo mensageiro, de modo que o receptor atua como transdutor e amplificador de sinal. O sinal pode, ainda, ser amplificado por uma cascata de sinalização, uma série de etapas em que um catalisador (como uma proteína-cinase) ativa outro catalisador (outra proteína-cinase), resultando em ampliações muito grandes do sinal original. Uma cascata desse tipo ocorre na regulação, pela adrenalina, da síntese e da degradação do glicogênio (ver Figura 12-7). A adrenalina ativa (por meio de seu receptor) a adenilil-ciclase, que produz muitas moléculas de cAMP para cada molécula de hormônio ligada ao receptor. O cAMP, por sua vez, ativa a proteína-cinase dependente de cAMP (proteína-cinase A), a qual ativa a glicogênio-fosforilase *b*-cinase, que ativa a glicogênio-fosforilase *b*. O resultado é a amplificação do sinal: uma molécula de adrenalina induz a produção de muitos milhares ou milhões de moléculas de glicose-1-fosfato a partir do glicogênio.

Os hormônios insolúveis em água (hormônios esteroides, retinoides e tireóideos) atravessam a membrana plasmática de suas células-alvo para alcançar suas proteínas receptoras no núcleo (Figura 23-3). O próprio complexo hormônio-receptor carrega a mensagem: ele interage com o DNA para alterar a expressão de genes específicos, alterando o complemento enzimático da célula e, desse modo, alterando o metabolismo celular (Figura 12-30).

Os hormônios que atuam por meio de receptores de membrana plasmática geralmente provocam respostas bioquímicas ou fisiológicas muito rápidas. Poucos segundos após a secreção de adrenalina pela medula da glândula suprarrenal para a corrente sanguínea, o músculo esquelético responde, acelerando a degradação de glicogênio. Em contrapartida, os hormônios da tireoide e os hormônios sexuais (esteroides) promovem respostas máximas em seus tecidos-alvo somente após horas ou mesmo dias. Essas diferenças no tempo de resposta correspondem a modos diferentes de ação. Em geral, os hormônios de ação rápida levam a uma mudança na atividade de uma ou mais enzimas preexistentes na célula, por mecanismos alostéricos ou modificação covalente. Os hormônios de ação mais lenta geralmente alteram a expressão gênica, resultando na síntese



de mais (regulação positiva) ou menos (regulação negativa) quantidade da(s) proteína(s) regulada(s).

Os hormônios são quimicamente diferentes

Os mamíferos têm várias classes de hormônios, distinguíveis por suas estruturas químicas e por seu mecanismo de ação (Tabela 23-1). Os hormônios peptídicos, as catecolaminas e os eicosanóides agem a partir do exterior da célula-alvo por meio de receptores de superfície. Os hormônios

FIGURA 23-3 Dois mecanismos gerais da ação hormonal. Os hormônios peptídicos e do tipo amina agem mais rapidamente do que os hormônios esteróides e os tireóideos.

esteróides, a vitamina D, os retinóides e os hormônios da tireoide entram na célula e atuam por meio de receptores nucleares. O óxido nítrico (um gás) também entra na célula, mas ativa uma enzima citosólica, a guanilato-ciclase (ver Figura 12-23).

Os hormônios também podem ser classificados pelo trajeto que fazem desde o ponto de liberação até as células-alvo. Os hormônios **endócrinos** (do grego, *endon*, “dentro de”, e *krinein*, “liberar”) são liberados no sangue e transportados para as células-alvo por todo o corpo (a insulina e o glucagon são exemplos). Os hormônios **parácrinos** são liberados no espaço extracelular e difundem-se para células-alvo vizinhas (os hormônios eicosanóides são desse tipo). Os hormônios **autócrinos** afetam a mesma célula que os libera, ligando-se a receptores na superfície celular.

Os mamíferos não são os únicos com sistemas de sinalização hormonal: os insetos e os vermes nematódeos têm sistemas de regulação hormonal altamente desenvolvidos, com mecanismos básicos similares aos dos mamíferos. As plantas também usam sinais hormonais para coordenar as atividades de seus tecidos.

Para ilustrar a diversidade estrutural e o espectro de ação dos hormônios dos mamíferos, serão estudados exemplos representativos das principais classes apresentadas na Tabela 23-1.

Hormônios peptídicos Os **hormônios peptídicos** variam em tamanho, de 3 a mais de 200 resíduos de aminoácidos. Eles incluem os hormônios pancreáticos insulina, glucagon e somatostatina, o hormônio paratireóideo calcitonina e todos os hormônios do hipotálamo e da hipófise (descritos a seguir). Esses hormônios são sintetizados nos ribossomos na forma de proteínas precursoras mais longas (pró-hormônios), sendo, então, acondicionados em vesículas secretoras e processados proteoliticamente para formar os peptídeos ativos. Em muitos hormônios peptídicos, como no TRH, os resíduos terminais são modificados (Figura 23-2).

TABELA 23-1 Classes de hormônios

Tipo	Exemplo	Via de síntese	Modo de ação
Peptídeo	Insulina, glucagon	Processamento proteolítico do pró-hormônio	Receptores de membrana plasmática; segundos mensageiros
Catecolamina	Adrenalina	A partir da tirosina	
Eicosanoide	Prostaglandina E ₂	A partir do araquidonato (ácido graxo 20:4)	
Esteróide	Testosterona	A partir do colesterol	Receptores nucleares; regulação da transcrição
Vitamina D	Calcitriol	A partir do colesterol	
Retinoide	Ácido retinoico	A partir da vitamina A	
Tireoide	Tri-iodotironina (T ₃)	A partir da tirosina na tireoglobulina	Receptor citosólico (guanilato-ciclase) e segundo mensageiro (cGMP)
Óxido nítrico	Óxido nítrico	A partir da arginina + O ₂	

A **insulina** é uma proteína pequena (M_r 5.800) com duas cadeias polipeptídicas, A e B, unidas por duas ligações dissulfeto. Ela é sintetizada no pâncreas como um precursor inativo de uma só cadeia, a pré-pró-insulina (**Figura 23-4**), com uma “sequência sinalizadora” aminoterminal que direciona sua passagem para as vesículas secretoras. (As sequências sinalizadoras são apresentadas no Capítulo 27; ver a Figura 27-40.) A remoção proteolítica da sequência-sinal e a formação de três ligações dissulfeto produzem pró-insulina, que é armazenada em grânulos secretores (vesículas membranares preenchidas com proteína sintetizada no RE) em células β -pancreáticas. Quando a glicose sanguínea estiver suficientemente elevada para desencadear a secreção da insulina, a pró-insulina é convertida em insulina ativa por proteases específicas, que hidrolisam duas ligações peptídicas e formam a molécula de insulina madura e o peptídeo C, que são liberados por exocitose no sangue. Todos os três fragmentos têm efeitos fisiológicos: a insulina estimula a captação de glicose e sín-

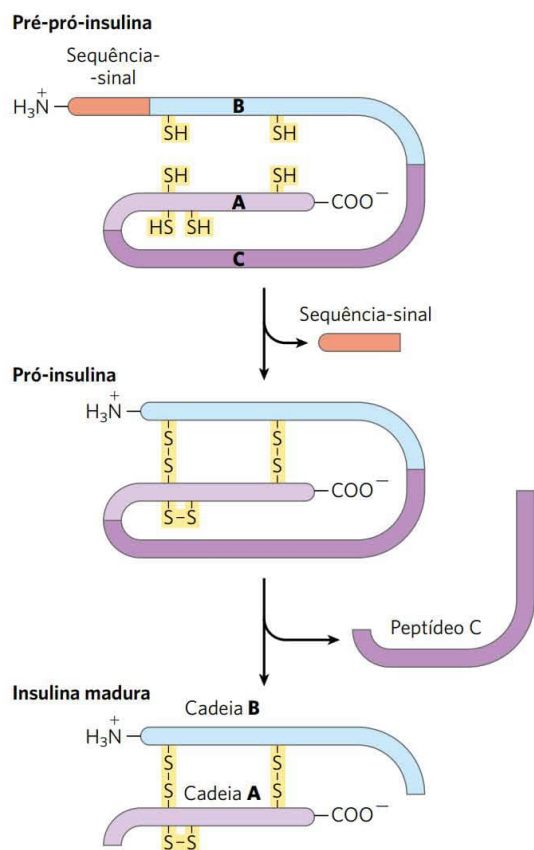


FIGURA 23-4 Insulina. A insulina madura é formada por processamento proteolítico de seu precursor mais longo, a pré-pró-insulina. A remoção de um segmento de 23 aminoácidos (a sequência sinalizadora) da extremidade aminoterminal da pré-pró-insulina e a formação de três ligações dissulfeto geram a pró-insulina. Uma proteólise adicional remove o peptídeo C da pró-insulina e produz a insulina madura, composta pelas cadeias A e B. A Figura 3-24 mostra a sequência de aminoácidos da insulina bovina.

tese de gordura, e o peptídeo C age por meio de receptores acoplados à proteína G (GPCR) em vários tecidos para mitigar os efeitos da redução da síntese de insulina, como a nevralgia que ocorre no diabetes.

Há outros casos em que as proteínas pró-hormônio sofrem clivagem específica para produzir vários hormônios ativos. A pró-opiomelanocortina (POMC) é um exemplo espetacular. O gene da POMC codifica um polipeptídeo grande que é progressivamente dividido em pelo menos nove peptídeos biologicamente ativos (**Figura 23-5**).

A concentração dos hormônios peptídicos nos grânulos secretores é tão alta que o conteúdo da vesícula é praticamente cristalino; quando o conteúdo é liberado por exocitose, uma grande quantidade do hormônio é liberada rapidamente. Os capilares que irrigam as glândulas endócrinas produtoras de peptídeos são fenestrados (pontuados com minúsculos orifícios ou “janelas”), de modo que as moléculas do hormônio entram rapidamente na corrente sanguínea para transporte para as células-alvo situadas em outros lugares. Conforme observado anteriormente, todos os hormônios peptídicos agem pela ligação aos receptores na membrana plasmática. Eles levam à geração de um segundo mensageiro no citosol, que muda a atividade de uma enzima intracelular, alterando, assim, o metabolismo celular.

Hormônios catecolamínicos Os compostos hidrossolúveis **adrenalina (epinefrina)** e **noradrenalina (norepinefrina)** são **catecolaminas**, assim denominadas por serem estru-

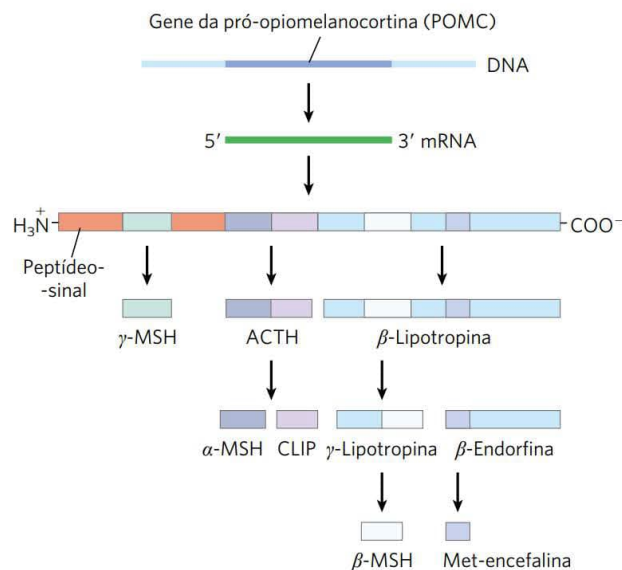
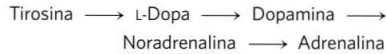


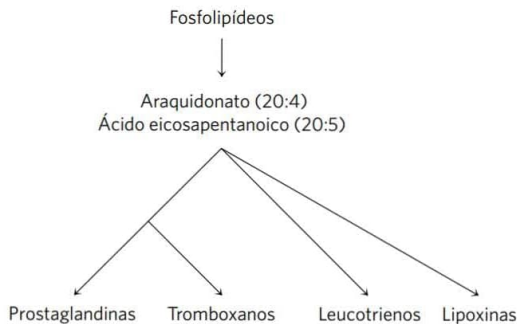
FIGURA 23-5 Processamento proteolítico do precursor pró-opiomelanocortina (POMC). O produto gênico inicial do gene POMC é um longo polipeptídeo que sofre clivagem por uma série de proteases específicas para produzir ACTH (corticotrofina), β e γ -lipotropina, α , β e γ -MSH (hormônio estimulador de melanócitos ou melanocortina), CLIP (peptídeo intermediário semelhante à corticotrofina), β -endorfina e Met-enkefalina. Os pontos de hidrólise são pares de resíduos básicos, Arg-Lys, Lys-Arg ou Lys-Lys.

turalmente relacionadas ao composto catecol. São sintetizadas a partir da tirosina (ver Figura 22-31).



As catecolaminas produzidas no cérebro e em outros tecidos neurais atuam como neurotransmissores, mas a adrenalina e a noradrenalina também são hormônios, sintetizados e secretados pelas glândulas suprarrenais. À semelhança dos hormônios peptídicos, as catecolaminas encontram-se altamente concentradas nas vesículas secretoras, são liberadas por exocitose e atuam por meio de receptores de superfície para gerar segundos mensageiros intracelulares. Elas controlam uma ampla variedade de respostas fisiológicas ao estresse agudo (ver Tabela 23-7).

Hormônios eicosanoides Os **hormônios eicosanoides** (prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e lipoxinas) são derivados do ácido graxo poli-insaturado de 20 carbonos araquidonato ($20:4(\Delta^{5,8,11,14})$) e ácido eicosapentanoico (EPA; $20:5(\Delta^{5,8,11,14,17})$; ver Figura 21-12).



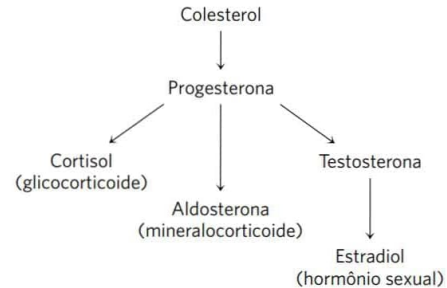
Ao contrário dos hormônios descritos acima, eles não são sintetizados antecipadamente e armazenados; eles são produzidos quando necessário. As enzimas da via que leva às prostaglandinas e aos tromboxanos estão amplamente distribuídas nos tecidos dos mamíferos; a maioria das células pode produzir esses sinais hormonais, e as células de muitos tecidos podem responder a eles por meio de receptores específicos na membrana plasmática. Os hormônios eicosanoides são hormônios parácrinos, secretados no líquido intersticial (não no sangue), e agem em células próximas.



Algumas prostaglandinas promovem a contração da musculatura lisa, incluindo a do intestino e do útero (podendo, dessa forma, ser utilizadas na clínica para induzir o parto). Elas também mediam dor e inflamação em alguns tecidos. Muitos fármacos anti-inflamatórios agem inibindo etapas da via de síntese das prostaglandinas (ver Figura 21-15). Os tromboxanos regulam a função das plaquetas e, consequentemente, a coagulação sanguínea (ver Figura 6-41). Os leucotrienos LTC_4 e LTD_4 agem por meio de receptores de membrana, estimulando a contração da musculatura lisa no intestino, nas vias aéreas pulmonares e na traqueia. São mediadores da anafilaxia, resposta imune exagerada que pode incluir constrição das vias aéreas, frequência cardíaca alterada, choque e, às vezes, mor-

te. As lipoxinas são derivados eicosanoides de vida curta com efeitos potentes na função imune; eles aparecem na corrente circulatória no final da inflamação. ■

Hormônios esteroides Os **hormônios esteroides** – hormônios corticosteroides (adrenocortical) e hormônios sexuais – são sintetizados a partir do colesterol em vários tecidos endócrinos.

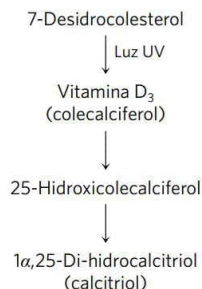


Eles deslocam-se até suas células-alvo pela corrente sanguínea, ligados a proteínas carregadoras. No córtex da glândula suprarrenal são produzidos mais de 50 hormônios corticosteroides, por reações que removem a cadeia lateral do anel D do colesterol e introduzem oxigênio, formando grupos cetona e hidroxila. Muitas dessas reações são catalisadas por enzimas que contêm citocromo P-450 (ver Quadro 21-1). Os corticosteroides são de dois tipos gerais, definidos por suas ações. Os glicocorticoides, como o cortisol, atuam principalmente no metabolismo dos carboidratos; os mineralocorticoides, como a aldosterona, regulam as concentrações de eletrólitos (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Cl^-) no sangue. Dois tipos de hormônios sexuais, os androgênios (incluindo a testosterona) e estrogênios (incluindo o estradiol; ver Figura 10-18), são sintetizados nos testículos e nos ovários. Eles afetam o desenvolvimento e o comportamento sexuais e uma grande variedade de outras funções reprodutivas e não reprodutivas. Sua síntese também envolve as enzimas do citocromo P-450 que clivam a cadeia lateral do colesterol e introduzem átomos de oxigênio.

Todos os hormônios esteroides atuam por meio de receptores nucleares e alteram o nível de expressão de genes específicos (ver Figura 12-30). Eles também podem ter efeitos mais rápidos, mediados por receptores na membrana plasmática. Os seres humanos e outros animais são expostos a muitos produtos químicos exógenos, amplamente chamados de “desreguladores endócrinos”, que vão desde poluentes ambientais, como PCB (bifenilas policloradas), pesticidas e produtos farmacêuticos, até estrogênios naturais em plantas, como certos produtos de soja. Alguns desreguladores endócrinos se ligam a receptores nucleares de esteroides e estimulam efeitos semelhantes aos hormônios; outros bloqueiam os receptores, impedindo a estimulação por hormônios endógenos ou interferindo no metabolismo normal dos hormônios esteroides no fígado.

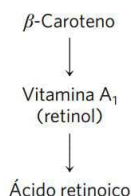
Hormônio da vitamina D O **Calcitriol** ($1\alpha,25$ -di-hidroxicalcitriol) é produzido a partir da vitamina D por hidroxilação catalisada por enzimas no fígado e nos rins (Figura 10-19a).

A vitamina D é obtida da dieta ou por fotólise do 7-desidrocolesterol na pele exposta à luz solar.



O calcitriol atua juntamente com o hormônio paratireoide no homeostasia do Ca^{2+} , regulando a concentração desse íon no sangue e o equilíbrio entre a deposição de Ca^{2+} e a sua mobilização do osso. O calcitriol, agindo por meio de receptores nucleares, ativa a síntese de uma proteína intestinal ligadora de Ca^{2+} essencial para a captação de Ca^{2+} da dieta. Ingestão inadequada de vitamina D e defeitos na biossíntese de calcitriol resultam em doenças graves, como o raquitismo, no qual os ossos são fracos e malformados (ver Figura 10-19b). ■

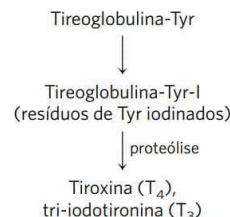
Hormônios retinoides Os **hormônios retinoides** são hormônios potentes que regulam o crescimento, a sobrevivência e a diferenciação de células por meio de receptores retinoides nucleares. O pró-hormônio retinol é sintetizado a partir do β -caroteno, principalmente no fígado (ver Figura 10-20), e muitos tecidos convertem o retinol no hormônio ácido retinoico (RA). O RA liga-se ao seu receptor específico (RAR) no núcleo, forma um dímero com outra proteína nuclear, o receptor retinoide X (RRX), e altera a taxa de expressão de genes responsivos ao RA.



Todos os tecidos são alvo dos retinoides, pois todos os tipos celulares têm pelo menos uma forma de receptor retinoide nuclear. Nos adultos, os alvos mais significativos incluem córnea, pele, epitélios dos pulmões e da traqueia e o sistema imune, todos submetidos à constante renovação de células. O ácido retinoico regula a síntese de proteínas essenciais para o crescimento ou para a diferenciação. Vitamina A em excesso (o precursor dos hormônios retinoides) pode causar defeitos de nascença, e mulheres grávidas são orientadas a não usar os cremes com retinoides desenvolvidos para o tratamento de casos graves de acne. ■

Hormônios da tireoide Os **hormônios da tireoide** T_4 (tiroxina) e T_3 (tri-iodotironina) são sintetizados a partir da proteína precursora tireoglobulina (M_r 660.000). Até 20 resíduos de Tyr na proteína são iodinados enzimaticamente na

glândula tireoide, e dois resíduos de iodotirosina são, então, condensados para formar o precursor da tiroxina. Quando necessário, a tiroxina é liberada por proteólise. A condensação da monoiodotirosina com a di-iodotironina produz T_3 , que também é um hormônio ativo liberado por proteólise.



Os hormônios tireoideos agem por meio de receptores nucleares e estimulam o metabolismo energético, sobretudo no fígado e no músculo, aumentando a expressão de genes que codificam enzimas catabólicas chave. A subprodução de tiroxina torna o metabolismo mais lento e pode ser causa de depressão. Quando a subprodução é o resultado de muito pouco iodo na dieta, a glândula tireoide aumenta em uma tentativa inútil de produzir mais tiroxina (Figura 23-6).

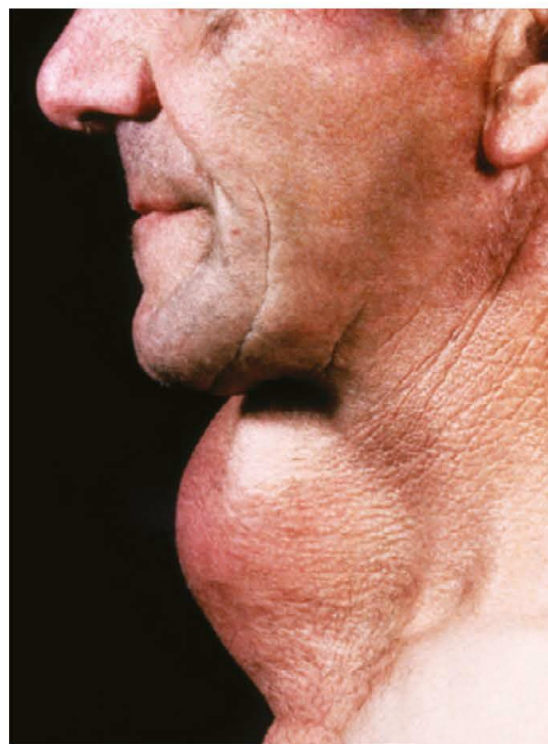
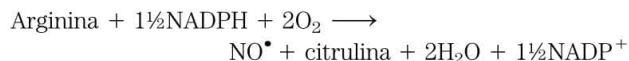


FIGURA 23-6 Bócio. Uma pessoa com bócio avançado. O bócio é um aumento da glândula tireoide que pode ocorrer em uma tentativa inútil de produzir hormônio tireoide na ausência de iodo. Sal iodado na dieta previne o desenvolvimento de bócio, exceto em casos raros de um defeito genético. *Online Mendelian Inheritance in Man* (omim.org.), um catálogo on-line de doenças genéticas humanas, documenta várias condições genéticas, incluindo mutações no gene da tireoglobulina, que podem causar o desenvolvimento de bócio. [Fonte: Biophoto Associates/Science Source.]

Essa condição, chamada de bócio, já foi comum em regiões distantes dos oceanos (que fornecem iodo na forma de frutos do mar frescos) e áreas com solo com baixo teor de iodo (produzindo plantas com baixo teor de iodo). O bócio foi quase eliminado em áreas onde o iodo é rotineiramente adicionado ao sal de cozinha.

Óxido nítrico (NO') O **óxido nítrico** é um radical livre relativamente estável sintetizado a partir de uma molécula de oxigênio e do nitrogênio guanidínico da arginina (ver Figura 22-33), em uma reação catalisada pela **NO-sintase**.



Esta enzima é encontrada em muitos tecidos e tipos celulares: neurônios, macrófagos, hepatócitos, miócitos do músculo liso, células endoteliais dos vasos sanguíneos e células epiteliais do rim. O NO age próximo de seu local de liberação, entrando na célula-alvo e ativando a enzima citosólica guanilato-ciclase, que catalisa a formação do segundo mensageiro cGMP (ver Figura 12-23). Uma proteína-quinase dependente de cGMP controla os efeitos do NO pela fosforilação de proteínas-chave e pela consequente alteração de suas atividades. A fosforilação das proteínas contráteis da musculatura lisa que envolve os vasos sanguíneos, por exemplo, relaxa o músculo, reduzindo a pressão sanguínea.

A liberação de hormônios é regulada por uma hierarquia de “cima para baixo” de sinais neuronais e hormonais

Os níveis alterados de hormônios específicos regulam processos celulares específicos, mas o que regula o nível de cada hormônio? A resposta simples é que o sistema nervoso central recebe informações vindas de muitos sensores externos e internos – por exemplo, sinais sobre perigo, fome, alimento ingerido, composição e pressão sanguínea – e coordena a produção de sinais hormonais adequados pelos tecidos endócrinos. Para uma resposta mais completa, é preciso considerar os sistemas produtores de hormônios do corpo humano e algumas de suas inter-relações funcionais.

A **Figura 23-7** mostra a posição anatômica das principais glândulas endócrinas em seres humanos, e a **Figura 23-8** mostra a “cadeia de comando” na hierarquia da sinalização hormonal. O **hipotálamo**, pequena região do cérebro (**Figura 23-9**), é o centro de coordenação do sistema endócrino; ele recebe e integra as mensagens do sistema nervoso central. Em resposta a essas mensagens, o hipotálamo produz hormônios reguladores (fatores de liberação) que passam diretamente para a glândula hipófise próxima a ele através de vasos sanguíneos especiais e neurônios que conectam as duas glândulas (**Figura 23-8b**). A glândula hipófise tem duas partes funcionalmente distintas. A **neuro-hipófise** contém os terminais axonais de muitos neurônios que se originam no hipotálamo. Esses neurônios produzem os pequenos hormônios peptídicos ocitocina e vasopressina (**Figura 23-10**), que se deslocam pelo axônio até os terminais nervosos na hipófise, onde são armazenados em grânulos secretores e aguardam o sinal para sua liberação.

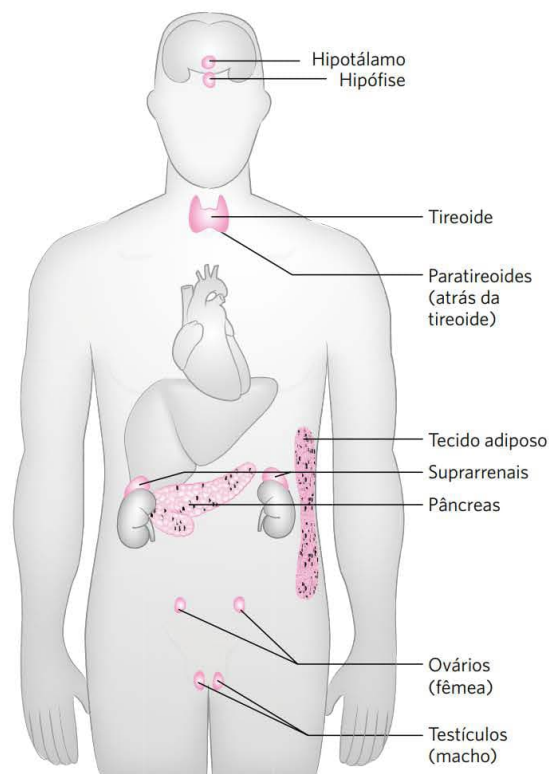


FIGURA 23-7 As principais glândulas endócrinas. As glândulas estão sombreadas em cor-de-rosa.

A **adeno-hipófise** responde aos hormônios hipotalâmicos transportados pelo sangue, produzindo **hormônios tróficos**, ou **trofinas** (do grego, *tropos*, “voltar-se para”). Esses peptídeos relativamente longos ativam a próxima classe de glândulas endócrinas (**Figura 23-8**), incluindo o córtex da glândula suprarrenal, a glândula tireoide, os ovários e os testículos. Essas glândulas, por sua vez, secretam seus hormônios específicos, que são transportados pela corrente sanguínea para os tecidos-alvo. Por exemplo, o hormônio liberador de corticotrofina secretado pelo hipotálamo estimula a adeno-hipófise a liberar ACTH, que viaja pelo sangue para a zona fasciculada do córtex da glândula suprarrenal e desencadeia a liberação de cortisol. Este, que é o último hormônio nessa cascata, age por meio de seu receptor em muitos tipos de células-alvo e altera o metabolismo celular. Nos hepatócitos, um dos efeitos do cortisol é o aumento da taxa de gliconeogênese.

As cascatas hormonais, como aquelas responsáveis pela liberação de cortisol e adrenalina, resultam em grande amplificação do sinal inicial e permitem um requintado ajuste fino do sinal do hormônio final (**Figura 23-11**). Em cada nível na cascata, um sinal pequeno provoca uma resposta maior. Por exemplo, o sinal elétrico inicial para o hipotálamo resulta na liberação de poucos *nanogramas* de hormônio liberador de corticotrofina, o qual provoca a liberação de poucos *microgramas* de corticotrofina. A corticotrofina atua sobre o córtex da glândula suprarrenal, causando a li-

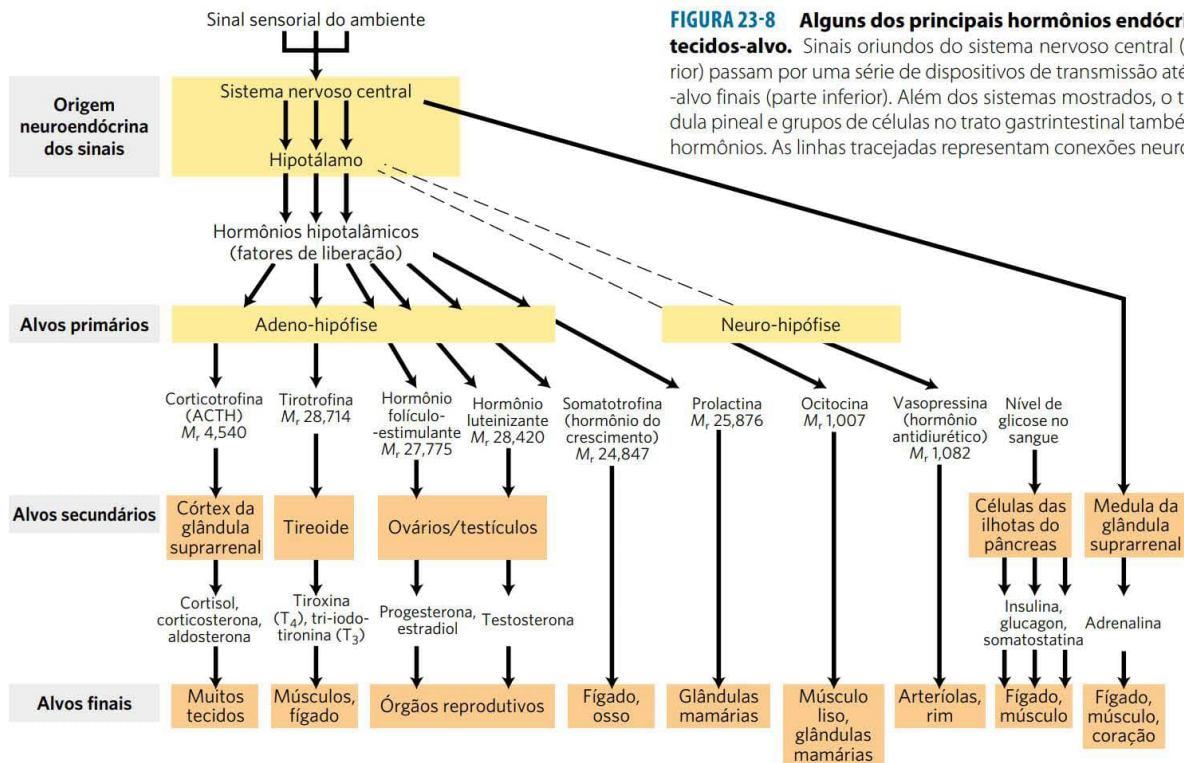


FIGURA 23-8 Alguns dos principais hormônios endócrinos e seus tecidos-alvo. Sinais oriundos do sistema nervoso central (parte superior) passam por uma série de dispositivos de transmissão até os tecidos-alvo finais (parte inferior). Além dos sistemas mostrados, o timo, a glândula pineal e grupos de células no trato gastrointestinal também secretam hormônios. As linhas tracejadas representam conexões neuronais.

beração de *miligramas* de cortisol, uma amplificação total de pelo menos um milhão de vezes.

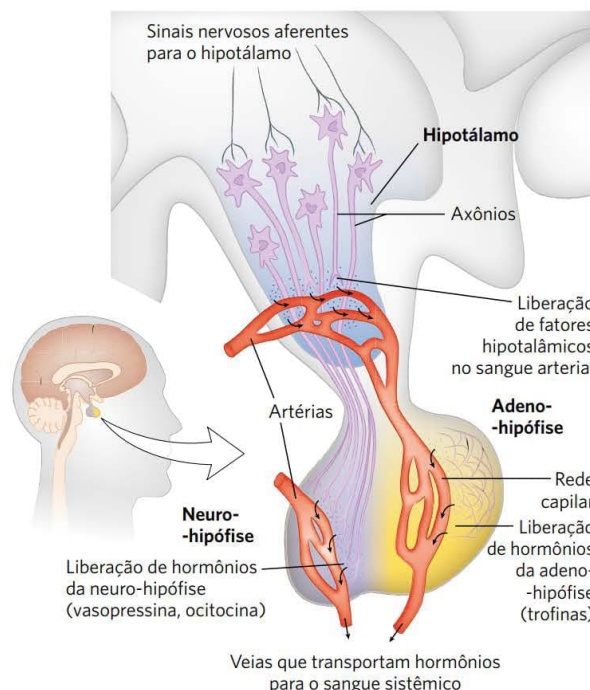
Em cada nível da cascata hormonal, é possível uma retroalimentação negativa das etapas prévias; um nível desnecessariamente elevado do último hormônio ou de um intermediário inibe a liberação dos hormônios anteriores na cascata. Esses mecanismos de retroalimentação cumprem a mesma finalidade daqueles que limitam o produto de uma via biossintética (comparar a Figura 23-11 com a Figura 22-37): um produto é sintetizado (ou liberado) somente até que seja alcançada a concentração necessária.

Os sistemas hormonais de “baixo para cima” enviam sinais de volta para o cérebro e para outros tecidos

Além da hierarquia de sinalização hormonal de cima para baixo, mostrada na Figura 23-8, alguns hormônios são produzidos no sistema digestório, no músculo e no tecido adiposo e comunicam o estado metabólico do momento ao

hipotálamo (Figura 23-12). Estes sinais são integrados no hipotálamo, e uma resposta neuronal ou hormonal apropriada é induzida. A ação da enzima proteína-cinase ativada por AMP (AMPK) no hipotálamo é um desses mecanismos in-

FIGURA 23-9 Origem neuroendócrina dos sinais hormonais. Localização do hipotálamo e da hipófise e detalhes do sistema hipotalâmico-hipofisiário. Os sinais dos neurônios aferentes estimulam o hipotálamo a secretar fatores de liberação para um vaso sanguíneo que transporta os hormônios diretamente para uma rede de capilares na adeno-hipófise (ou hipófise anterior). Em resposta a cada fator de liberação hipotalâmico, a adeno-hipófise libera na circulação geral o hormônio apropriado. Os hormônios da neuro-hipófise (ou hipófise posterior) são sintetizados nos neurônios originários do hipotálamo, transportados ao longo dos axônios até as terminações nervosas na neuro-hipófise e ali armazenados até serem liberados no sangue em resposta a um sinal neuronal.



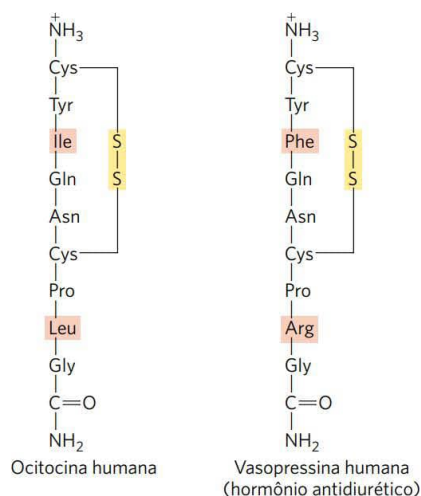


FIGURA 23-10 Dois hormônios da neuro-hipófise. O resíduo carboxiterminal dos dois peptídeos é a glicinamida, $\text{—NH—CH}_2\text{—CONH}_2$ (conforme observado na Figura 23-2, a amidação da extremidade carboxiterminal é comum em hormônios peptídicos pequenos). Esses dois hormônios, que são idênticos em tudo, exceto em apenas dois resíduos (sombreados em cor salmão), têm efeitos biológicos muito diferentes. A ocitocina age na musculatura lisa do útero e das glândulas mamárias, causando contração uterina durante o trabalho de parto e promovendo a liberação do leite durante a lactação. A vasopressina (também chamada de hormônio antidiurético) aumenta a reabsorção de água pelos rins e promove a constrição dos vasos sanguíneos, aumentando a pressão sanguínea.

tegradores. Ela soma várias entradas e passa a informação pela fosforilação de proteínas-chave no hipotálamo. As entradas hormonais conhecidas nesse mecanismo são muitas e, sem dúvida, outras serão descobertas.

As **adipocinas**, por exemplo, são hormônios peptídicos, produzidos no tecido adiposo, que sinalizam a adequação das reservas de gordura. A **leptina**, liberada quando o tecido adiposo fica repleto de triacilgliceróis, atua no cérebro

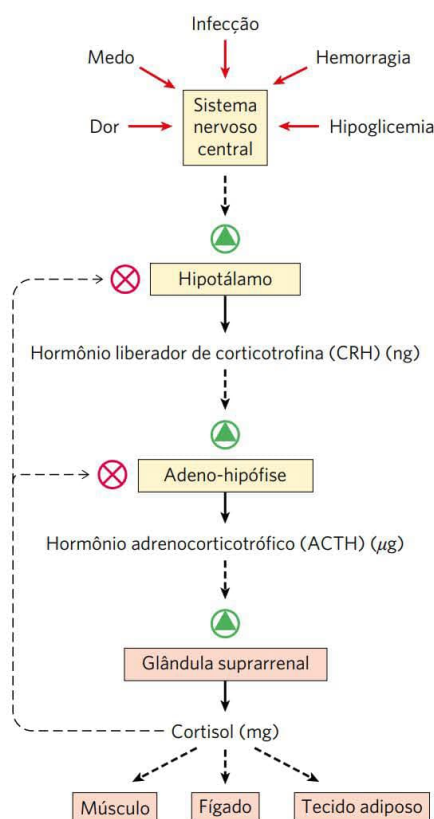


FIGURA 23-11 Cascata de liberação de hormônios em consequência da estimulação do hipotálamo pelo sistema nervoso central. As setas pretas sólidas indicam produção e liberação de hormônios. As setas pretas tracejadas indicam a ação dos hormônios sobre os tecidos-alvo. Em cada tecido endócrino ao longo da via, um estímulo é recebido do nível superior, o qual é amplificado e transduzido na liberação do hormônio seguinte na cascata. A cascata é sensível à regulação em vários níveis por meio de retroalimentação negativa (setas finas e tracejadas) pelo último hormônio (neste caso, o cortisol). Dessa forma, o produto regula sua própria produção, como na retroalimentação negativa das vias biossintéticas em uma célula individual.

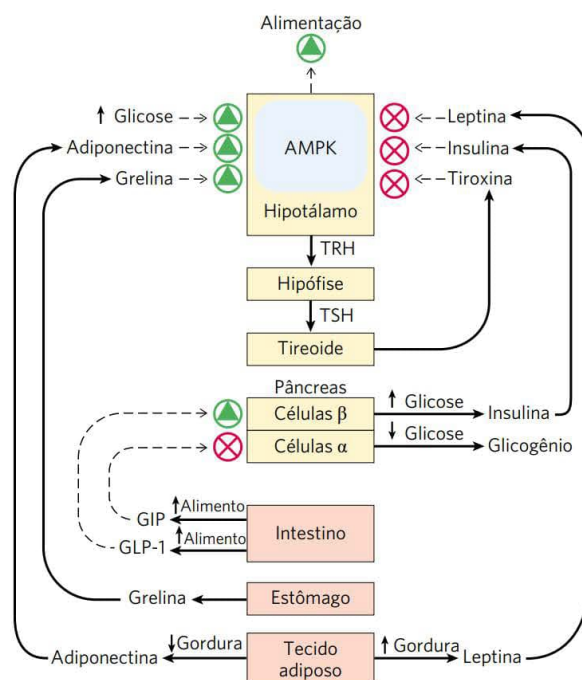


FIGURA 23-12 Regulação do comportamento alimentar pelo fluxo de informações bidirecional entre os tecidos e o hipotálamo. Quando a ingestão alimentar e a produção de energia são adequadas, os hormônios peptídicos liberados pelo estômago, intestino e tecido adiposo retornam ao hipotálamo para sinalizar a saciedade e reduzir o comportamento alimentar. Outros hormônios peptídicos tecido-específicos indicam um suprimento inadequado de triacilgliceróis armazenados ou baixos níveis de glicose no sangue. Todos esses sinais interferem, direta ou indiretamente, na proteína-cinase ativada por AMP (AMPK) no hipotálamo, que integra esses sinais e influencia o comportamento alimentar e o metabolismo de produção de energia nos tecidos. Os nervos transportam sinais elétricos do cérebro para os outros tecidos para completar o circuito de informação e alcançar a homeostasia (não mostrado). TRH, hormônio liberador de tireotrofina; GLP-1, peptídeo do tipo glucagon 1; GIP, polipeptídeo inibidor gástrico.

TABELA 23-2 Alguns hormônios peptídicos que atuam no comportamento alimentar e na seleção de alimentos em mamíferos

Hormônio	Local(is) de produção	Tecido(s)-alvo	Ação(ões)
Insulina	Células β -pancreáticas	Músculo, tecido adiposo, fígado	Estimula a captação de glicose e a síntese de glicogênio e gordura
Glucagon	Células α -pancreáticas	Fígado, tecido adiposo	Estimula a gliconeogênese e a liberação de glicose para o sangue
Leptina	Tecido adiposo	Hipotálamo	Reduz a fome
Adiponectina	Tecido adiposo	Músculo, fígado, outros	Estimula o catabolismo
Grelina	Estômago, intestino	Cérebro	Sinaliza fome
Incretinas: GLP-1, GIP	Intestino	Pâncreas	Estimula a liberação de insulina
NPY	Hipotálamo, suprarrenais	Cérebro, sistema nervoso autônomo	Estimula o comportamento alimentar
PYY ₃₋₃₆	Intestino	Cérebro	Sinaliza saciedade
Irisina	Músculo (após exercício)	Tecido adiposo	Transforma o tecido adiposo branco em bege

para inibir o comportamento alimentar, ao passo que a **adiponectina** sinaliza o esgotamento das reservas de gordura e estimula a alimentação. A **grelina** é produzida no trato gastrointestinal quando o estômago está vazio e atua no hipotálamo para estimular o comportamento alimentar; quando o estômago está cheio, a liberação de grelina cessa. As **incretinas** são hormônios peptídicos produzidos no intestino após a ingestão de uma refeição; elas aumentam a secreção de insulina e diminuem a secreção de glucagon do pâncreas. As incretinas mais estudadas são **peptídeo tipo glucagon 1 (GLP-1)** e **polipeptídeo insulínico dependente de glicose (GIP)**, também conhecido como **polipeptídeo inibidor gástrico**.

O **neuropeptídeo Y (NPY)** é um hormônio produzido no sistema nervoso central (hipotálamo) e nas glândulas suprarrenais. Sua liberação estimula a alimentação e reduz o gasto de energia para atividades não essenciais. O **peptídeo YY (PYY₃₋₃₆)**, produzido no intestino, sinaliza saciedade. NPY e PYY₃₋₃₆ agem por meio de receptores acoplados à proteína G (RAPG; ver Capítulo 12).

A **irisina** é um hormônio peptídico produzido no músculo como resultado do exercício. Ela age para converter o tecido adiposo branco em tecido adiposo marrom ou bege, os quais dissipam energia como calor (ver Seção 23.2).

Todos esses hormônios, e mais, foram encontrados por funcionarem em ratos e camundongos usados em estudos experimentais de comportamento alimentar e obesidade, além de em seres humanos (Tabela 23-2). Voltaremos a esses hormônios quando for discutida a regulação do peso corporal em seres humanos (Seção 23.4).

RESUMO 23.1 Hormônios: estruturas diferentes para funções diferentes

- Os hormônios são mensageiros químicos secretados por determinados tecidos para o sangue ou para o líquido intersticial, servindo para regular a atividade de outras células ou tecidos.
- Radioimunoensaio e ELISA são duas técnicas muito sensíveis para a detecção e a quantificação de hormônios.

- Hormônios peptídicos, catecolaminas e eicosanoides ligam-se a receptores específicos na membrana plasmática de células-alvo, alterando o nível de um segundo mensageiro intracelular, sem entrarem na célula.
- Os hormônios esteroides, a vitamina D, os retinoides e os hormônios tireóideos entram nas células-alvo e alteram a expressão gênica, interagindo com receptores nucleares específicos.
- As cascatas hormonais, nas quais catalisadores ativam catalisadores, amplificam o estímulo inicial em várias ordens de grandeza, frequentemente em um tempo muito curto (segundos).
- Alguns hormônios são sintetizados como pró-hormônios e ativados por clivagem enzimática. Em alguns casos, como no da insulina, um único hormônio é produzido por clivagem proteolítica; em outros, como na POMC, são produzidos vários hormônios por clivagem de um único pró-hormônio.
- Os hormônios são regulados por uma hierarquia de interações entre o cérebro e as glândulas endócrinas: os impulsos nervosos estimulam o hipotálamo a enviar hormônios específicos para a glândula hipófise, estimulando (ou inibindo) a liberação de hormônios tróficos. Os hormônios da adeno-hipófise, por sua vez, estimulam outras glândulas endócrinas (tireoide, suprarrenais, pâncreas) a secretar seus hormônios característicos, que, por sua vez, estimulam tecidos-alvo específicos.
- Os hormônios peptídicos também atuam na sinalização de baixo para cima: tecido adiposo, músculo e trato gastrointestinal liberam hormônios peptídicos que atuam em outros tecidos ou no sistema nervoso central.

23.2 Metabolismo específico para cada tecido: a divisão de trabalho

Cada tecido do corpo humano tem uma função especializada, que se reflete na sua anatomia e atividade metabólica (**Figura 23-13**). O músculo esquelético permite o movimento di-

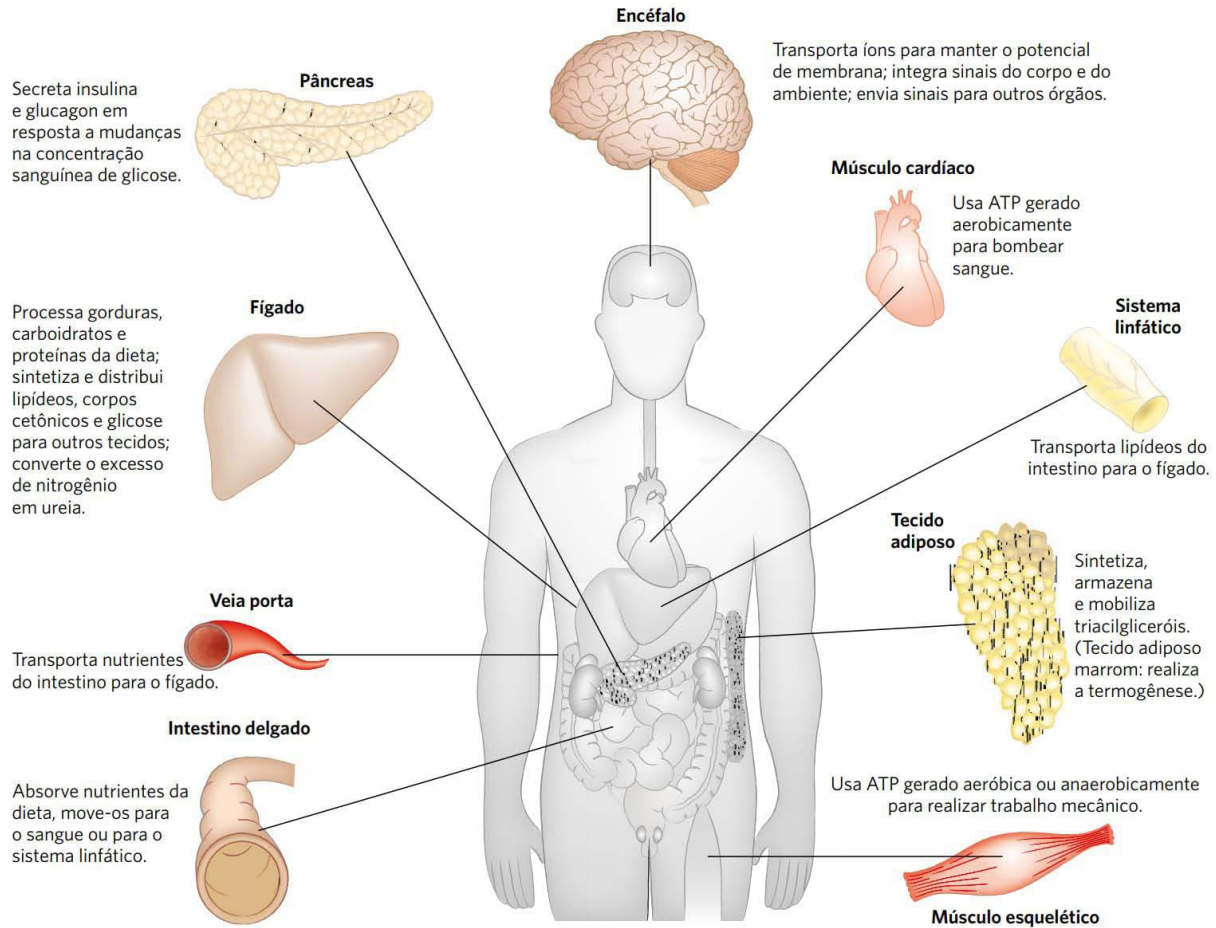


FIGURA 23-13 Funções metabólicas especializadas dos tecidos dos mamíferos.

recionado; o tecido adiposo armazena e distribui energia na forma de gordura, a qual serve como combustível para todo o corpo, bem como isolamento térmico; no cérebro, as células bombeiam íons através de suas membranas plasmáticas para produzir sinais elétricos. O fígado tem um papel central de processamento e distribuição no metabolismo e abastece todos os outros órgãos e tecidos com a mistura apropriada de nutrientes via corrente sanguínea. A posição central da função hepática é indicada pela referência comum que se faz a todos os outros tecidos e órgãos como “extra-hepáticos”. Por essa razão, a presente discussão começará com a divisão do trabalho metabólico, levando em conta as transformações de carboidratos, aminoácidos e gorduras no fígado dos mamíferos. Em seguida, será feita uma breve descrição das principais funções metabólicas do tecido adiposo, do músculo, do cérebro e do meio que os interconecta: o sangue.

O fígado processa e distribui os nutrientes

Durante a digestão nos mamíferos, as três classes principais de nutrientes (carboidratos, proteínas e gorduras) sofrem hidrólise enzimática em seus constituintes mais simples. Essa degradação é necessária porque as células epiteliais que revestem o lúmen intestinal absorvem somente moléculas relativamente pequenas. Muitos dos ácidos graxos e dos monoacilgliceróis liberados pela digestão das gorduras

no intestino são reunidos na forma de triacilgliceróis (TAG) dentro dessas células epiteliais.

Após serem absorvidos, muitos açúcares e aminoácidos, assim como alguns TAG reconstituídos, passam das células do epitélio intestinal para os capilares sanguíneos, sendo transportados para o fígado pela corrente sanguínea; os TAG restantes vão para o tecido adiposo via sistema linfático. A veia porta (Figura 23-13) é uma via direta dos órgãos digestórios para o fígado, e, por isso, esse órgão é o primeiro a ter acesso aos nutrientes ingeridos. O fígado tem dois tipos celulares principais. As células de Kupffer são fagócitos, importantes na função imune. Os **hepatócitos**, de maior interesse neste capítulo, transformam os nutrientes da dieta em combustíveis e precursores necessários para outros tecidos e os exportam pelo sangue. Os tipos e as quantidades de nutrientes fornecidos ao fígado são determinados pela dieta, o tempo entre as refeições e vários outros fatores. A demanda dos tecidos extra-hepáticos para combustíveis e precursores varia de um órgão para outro e com o nível de atividade e estado nutricional geral do indivíduo.

Para satisfazer essas condições variáveis, o fígado tem uma notável flexibilidade metabólica. Por exemplo, quando a dieta é rica em proteína, os hepatócitos produzem altos níveis de enzimas para o catabolismo dos aminoácidos e a gliconeogênese. Algumas horas após uma mudança para uma die-

ta rica em carboidratos, os níveis dessas enzimas começam a diminuir, e os hepatócitos aumentam a síntese de enzimas essenciais para o metabolismo de carboidratos e para a síntese de gorduras. As enzimas hepáticas apresentam uma taxa de renovação (são sintetizadas e degradadas) de 5 a 10 vezes maior que a da renovação de enzimas de outros tecidos, como o músculo. Os tecidos extra-hepáticos também podem ajustar seu metabolismo para as condições prevalentes, mas nenhum desses tecidos é tão adaptável quanto o fígado e nenhum é tão central ao metabolismo geral do organismo. A seguir, será apresentada uma visão geral dos destinos possíveis para açúcares, aminoácidos e lipídeos que entram no fígado a partir da corrente sanguínea. Para ajudar a lembrar das trans-

formações metabólicas discutidas aqui, a Tabela 23-3 mostra as principais vias e processos e indica, pelo número da figura, onde cada figura está apresentada em detalhes. Aqui, serão fornecidos resumos das vias, indicando as vias numeradas e as reações nas Figuras 23-12 a 23-16.

Açúcares O transportador de glicose dos hepatócitos (GLUT2) permite difusão passiva e rápida da glicose, de forma que a concentração desse açúcar em um hepatócito é essencialmente a mesma daquela no sangue. A glicose que entra nos hepatócitos é fosforilada pela glucocinase (hexocinase IV) para produzir glicose-6-fosfato. A glicocinase tem uma K_m para a glicose muito mais alta (10 mM), quando comparado com o das isoenzimas hexocinases em outras células (pp. 590-591),

TABELA 23-3 Vias do metabolismo de carboidratos, aminoácidos e gorduras ilustradas nos capítulos anteriores

Via	Figura de referência
<i>O ciclo do ácido cítrico</i> : acetil-CoA \longrightarrow 2CO ₂	16-7
<i>Fosforilação oxidativa</i> : síntese de ATP	19-19
Catabolismo de carboidratos	
<i>Glicogenólise</i> : glicogênio \longrightarrow glicose-1-fosfato \longrightarrow glicose sanguínea	15-27; 15-28
<i>Entrada de hexose na glicólise</i> : frutose, manose, galactose \longrightarrow glicose-6-fosfato	14-11
<i>Glicólise</i> : glicose \longrightarrow piruvato	14-2
<i>Reação da piruvato-desidrogenase</i> : piruvato \longrightarrow acetil-CoA	16-2
<i>Fermentação do ácido láctico</i> : glicose \longrightarrow lactato + 2ATP	14-4
<i>Via das pentoses-fosfato</i> : glicose-6-fosfato \longrightarrow pentose fosfato + NADPH	4-22
Anabolismo dos carboidratos	
<i>Gliconeogênese</i> : intermediários do ciclo do ácido cítrico \longrightarrow glicose	14-17
<i>Ciclo da glicose-alanina</i> : glicose \longrightarrow piruvato \longrightarrow alanina \longrightarrow glicose	18-9
<i>Síntese de glicogênio</i> : glicose-6-fosfato \longrightarrow glicose-1-fosfato \longrightarrow glicogênio	15-32
Metabolismo de aminoácidos e nucleotídeos	
<i>Degradação de aminoácidos</i> : aminoácidos \longrightarrow acetil-CoA, intermediários do ciclo do ácido cítrico	18-15
<i>Síntese de aminoácidos</i>	22-11
<i>Ciclo da ureia</i> : NH ₃ \longrightarrow ureia	18-10
<i>Ciclo da glicose-alanina</i> : alanina \longrightarrow glicose	18-9
<i>Síntese de nucleotídeos</i> : aminoácidos \longrightarrow purinas, pirimidinas	22-35; 22-38
<i>Síntese de hormônios e neurotransmissores</i>	22-31
Catabolismo de gorduras	
<i>β-Oxidação de ácidos graxos</i> : ácidos graxos \longrightarrow acetil-CoA	17-8
<i>Oxidação de corpos cetônicos</i> : β -hidroxibutirato \longrightarrow acetil-CoA \longrightarrow CO ₂ através do ciclo do ácido cítrico	17-19
Anabolismo de gorduras	
<i>Síntese de ácidos graxos</i> : acetil-CoA \longrightarrow ácidos graxos	21-6
<i>Síntese de triacilglicerol</i> : acetil-CoA \longrightarrow ácidos graxos \longrightarrow triacilglicerol	21-17 até 21-19
<i>Formação de corpos cetônicos</i> : acetil-CoA \longrightarrow acetoacetato, β -hidroxibutirato	17-18
<i>Síntese de colesterol e de ésteres de colesterol</i> : acetil-CoA \longrightarrow colesterol \longrightarrow ésteres de colesterol	21-33 até 21-38
<i>Síntese de fosfolipídeos</i> : ácidos graxos \longrightarrow fosfolipídeos	21-17; 21-23 até 21-28

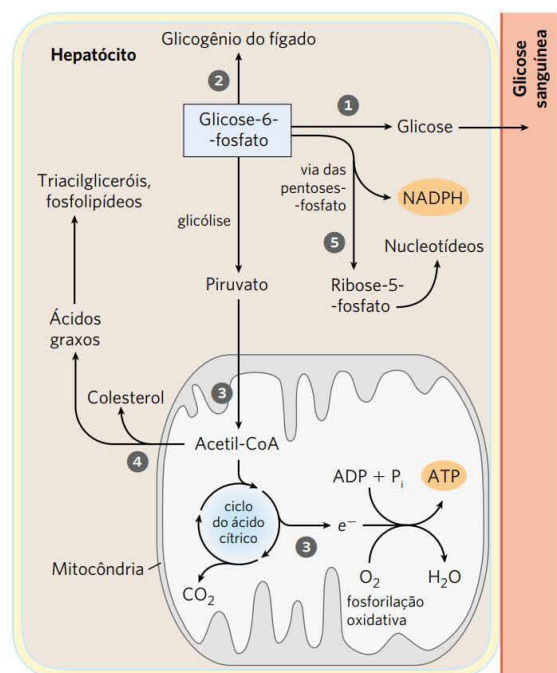


FIGURA 23-14 Vias metabólicas para a glicose-6-fosfato no fígado.

Nas Figuras 23-15, 23-16 e nesta, as vias anabólicas são representadas na ascendente, as vias catabólicas na descendente e a distribuição para outros órgãos na horizontal. Os processos numerados em cada figura estão descritos no texto.

e, ao contrário dessas isoenzimas, não é inibida por seu produto, a glicose-6-fosfato. A presença da glicocinase permite aos hepatócitos continuar fosforilando a glicose quando sua concentração se eleva muito acima dos níveis que sobrecarregariam outras hexocinases. A alta K_m para a glicocinase também garante que a fosforilação da glicose nos hepatócitos seja mínima quando a concentração do açúcar for baixa, evitando seu consumo via glicólise pelo fígado, como combustível. Isso poupa glicose para outros tecidos. A frutose, a galactose e a manose, todas absorvidas a partir do intestino delgado, também são convertidas em glicose-6-fosfato pelas vias enzimáticas descritas no Capítulo 14. A glicose-6-fosfato está na encruzilhada do metabolismo dos carboidratos no fígado. Ela pode entrar em qualquer de várias vias metabólicas importantes (**Figura 23-14**), dependendo das necessidades metabólicas do organismo. Pela ação de várias enzimas reguladas alostericamente e por meio de regulação hormonal da síntese e da atividade de enzimas, o fígado direciona o fluxo de glicose para uma ou mais dessas vias.

1 A glicose-6-fosfato é desfosforilada pela glicose-6-fosfatase para gerar glicose livre (ver Figura 15-30), exportada para repor a glicose sanguínea. A exportação é a via predominante quando o estoque de glicose-6-fosfato é limitado, uma vez que a concentração da glicose no sangue deve ser mantida suficientemente alta (4 a 5 mM) para fornecer energia adequada para o cérebro e outros tecidos.

2 A glicose-6-fosfato não imediatamente necessária para manter a glicemia é convertida em glicogênio hepático ou direcionada para um de vários outros destinos. Após a glicólise e a reação da piruvato-desidrogenase, 3 a acetil-CoA formada pode ser oxidada para a produção de ATP no ciclo

do ácido cítrico, com a transferência de elétrons e a fosforilação oxidativa decorrentes gerando ATP. (No entanto, geralmente os ácidos graxos são o combustível preferido para a produção de ATP nos hepatócitos.) 4 A acetil-CoA também pode servir como precursora dos ácidos graxos, que são incorporados em TAG e fosfolípidos, e do colesterol. Uma grande quantidade dos lipídeos sintetizados no fígado é transportada pelas lipoproteínas sanguíneas para outros tecidos. 5 A glicose-6-fosfato pode, alternativamente, entrar na via das pentoses-fosfato, gerando poder redutor (NADPH), necessário para a biossíntese de ácidos graxos e colesterol, e D-ribose-5-fosfato, precursor para a síntese de nucleotídeos. O NADPH também é um cofator essencial na destoxificação e eliminação de muitos fármacos e outros xenobióticos metabolizados no fígado.

Aminoácidos Os aminoácidos que chegam ao fígado seguem várias vias metabólicas importantes (**Figura 23-15**). 1 São precursores para a síntese proteica, processo discutido no Capítulo 27. O fígado repõe constantemente suas proteínas, que têm uma taxa de renovação relativamente alta (meia-vida média de horas a dias), sendo também o local de biossíntese da maioria das proteínas plasmáticas. 2 De modo alternativo, os aminoácidos passam via corrente sanguínea para outros órgãos, onde são usados na síntese das proteí-

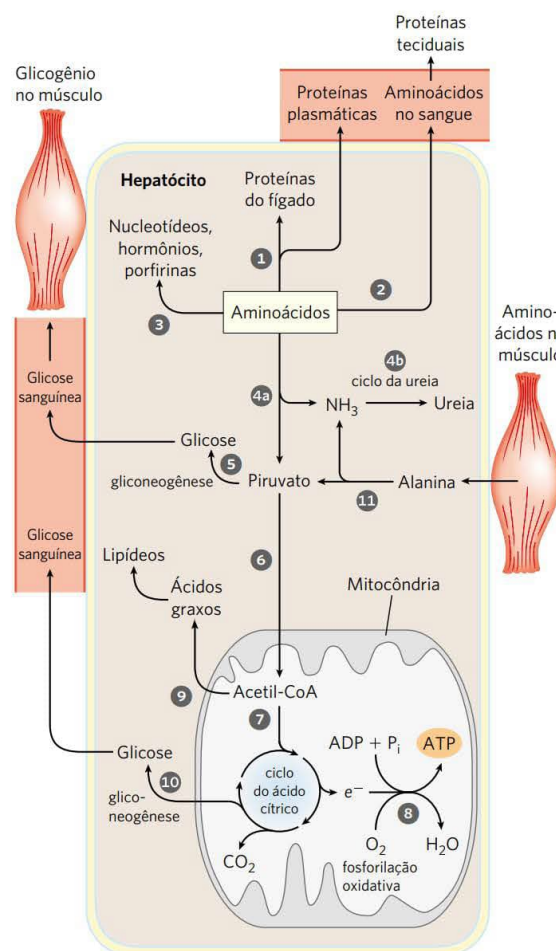


FIGURA 23-15 Metabolismo dos aminoácidos no fígado.

nas teciduais. ③ Outros aminoácidos são precursores na biossíntese de nucleotídeos, hormônios e outros compostos nitrogenados no fígado e em outros tecidos.

④ Os aminoácidos não utilizados como precursores biossintéticos são transaminados ou desaminados e degradados para gerar piruvato e intermediários do ciclo do ácido cítrico, com vários destinos; ④a a amônia liberada é convertida em ureia, um produto de excreção. ⑤ O piruvato pode ser convertido em glicose e glicogênio pela gliconeogênese, ou ⑥ pode ser convertido em acetil-CoA, que tem vários destinos possíveis: ⑦ oxidação via ciclo do ácido cítrico e ⑧ fosforilação oxidativa para produzir ATP, ou ⑨ conversão em lipídeos para armazenamento. ⑩ Os intermediários do ciclo do ácido cítrico podem ser desviados para a síntese de glicose pela gliconeogênese.

O fígado também metaboliza os aminoácidos que provêm intermitentemente de outros tecidos. O sangue é suprido adequadamente com glicose logo após a digestão e a absorção dos carboidratos da dieta ou, entre as refeições, pela conversão do glicogênio hepático em glicose sanguínea. Durante o intervalo entre as refeições, sobretudo se prolongado, algumas proteínas musculares são degradadas em aminoácidos. Estes aminoácidos doam seus grupos amina (por transaminação) ao piruvato, o produto da glicólise, para produzir alanina, que ⑪ é transportada para o fígado e desaminada. Os hepatócitos convertem o piruvato resultante em glicose sanguínea (via gliconeogênese ⑤), e a amônia em ureia para excreção ④b. Uma vantagem deste ciclo glicose-alanina (ver Figura 18-9) é amenizar flutuações nos níveis de glicose sanguínea nos intervalos entre as refeições. O déficit de aminoácidos imposto aos músculos é suprido após a próxima refeição pelos aminoácidos da dieta.

Lipídeos Os ácidos graxos componentes dos lipídeos que chegam aos hepatócitos também têm vários destinos (**Figura 23-16**). ① Alguns são convertidos em lipídeos hepáticos. ② Na maior parte das vezes, os ácidos graxos são o principal combustível oxidativo no fígado. Os ácidos graxos livres podem ser ativados e oxidados para gerar acetil-CoA e NADH. ③ A acetil-CoA é posteriormente oxidada no ciclo do ácido cítrico, e ④ as oxidações no ciclo promovem a síntese de ATP por fosforilação oxidativa. ⑤ O excesso de acetil-CoA, desnecessário para o fígado, é convertido em acetoacetato e β -hidroxibutirato; esses corpos cetônicos circulam pelo sangue para outros tecidos, para serem usados como combustível para o ciclo do ácido cítrico. Os corpos cetônicos, ao contrário dos ácidos graxos, podem atravessar a barreira hematoencefálica, fornecendo ao cérebro uma fonte de acetil-CoA para oxidação, com o objetivo de gerar energia. Os corpos cetônicos podem suprir uma fração significativa da energia em alguns tecidos extra-hepáticos – até um terço no coração e em torno de 60 a 70% no cérebro durante jejum prolongado. ⑥ Uma parte da acetil-CoA derivada dos ácidos graxos (e da glicose) é usada na biossíntese de colesterol, que é necessário para síntese de membranas. O colesterol também é o precursor de todos os hormônios esteroides e dos sais biliares, essenciais para a digestão e a absorção de lipídeos.

Os outros dois destinos metabólicos dos lipídeos necessitam de mecanismos especializados para o transporte de lipídeos insolúveis no sangue. ⑦ Os ácidos graxos são convertidos em fosfolipídeos e TAG de lipoproteínas plas-

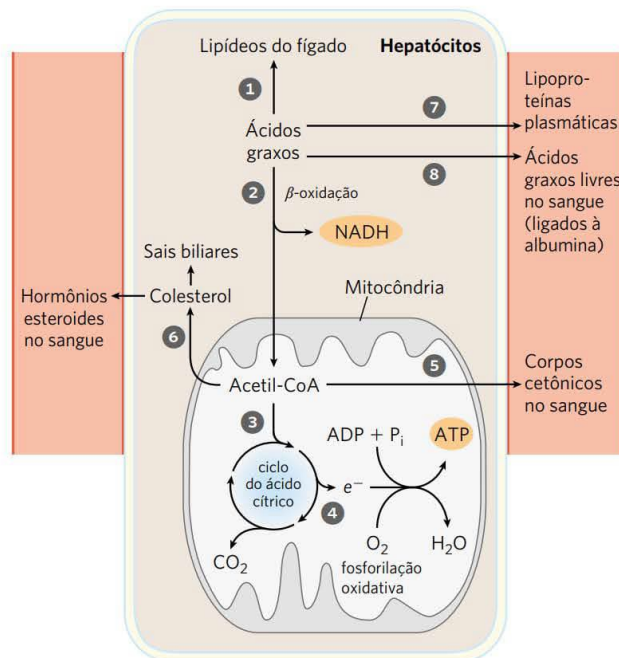


FIGURA 23-16 Metabolismo dos ácidos graxos no fígado.

máticas, que transportam os lipídeos para o tecido adiposo para serem armazenados. ⑧ Alguns ácidos graxos livres são ligados à albumina sérica e transportados para o coração e para os músculos esqueléticos, que os captam e oxidam como combustíveis importantes. A albumina é a proteína plasmática mais abundante; uma molécula pode transportar até 10 moléculas de ácidos graxos livres.

O fígado funciona, assim, como o centro de distribuição do organismo, exportando nutrientes nas proporções corretas para outros órgãos, reduzindo as flutuações no metabolismo causadas pela ingestão intermitente de alimento e processando o excesso de grupos amina em ureia e outros produtos para serem eliminados pelos rins. Determinados nutrientes são armazenados no fígado, entre eles íons ferro e vitamina A. O fígado também destoxifica compostos orgânicos estranhos, como fármacos, aditivos e conservantes alimentares e outros agentes potencialmente perigosos e sem valor nutricional. Muitas vezes, a destoxificação envolve a hidroxilação dependente do citocromo P-450 de compostos orgânicos relativamente insolúveis, tornando-os solúveis o suficiente para posterior degradação e excreção (ver Quadro 21-1).

O tecido adiposo armazena e provê ácidos graxos

Existem dois tipos distintos de tecido adiposo, o branco e o marrom (**Figura 23-17**), com papéis diferentes e, inicialmente, nosso foco será no mais abundante dos dois. O **tecido adiposo branco (TAB)** é amorfo e amplamente distribuído pelo corpo: sob a pele, ao redor dos vasos sanguíneos mais profundos e na cavidade abdominal. Os **adipócitos** do TAB são células grandes (30 a 70 μm de diâmetro), esféricas, totalmente preenchidas com uma única e grande gota lipídica de triacilgliceróis, a qual constitui 65% da massa celular e comprime as mitocôndrias e o núcleo em uma fina camada contra a membrana plasmática (Figura 23-17a, c).

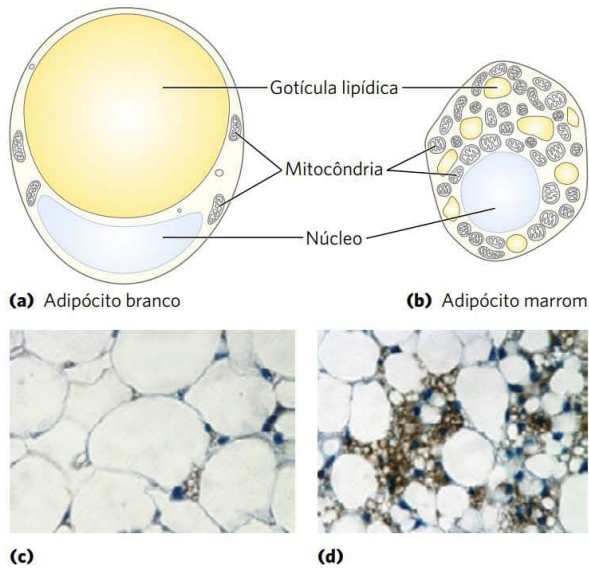


FIGURA 23-17 Tecidos adiposos branco e marrom. Visão esquemática de adipócitos de camundongo de (a) tecido adiposo branco (TAB) e (b) tecido adiposo marrom (TAM). Os adipócitos brancos são maiores e têm uma única gota lipídica enorme, que comprime as mitocôndrias e o núcleo contra a membrana plasmática. Nos adipócitos marrons, as mitocôndrias são muito mais proeminentes, o núcleo está próximo ao centro da célula e estão presentes múltiplas gotículas lipídicas. Na parte inferior, estão mostradas micrografias eletrônicas de (c) adipócitos no TAB, corados para mostrar os núcleos e (d) uma região de adipócitos brancos e marrons, corados com um anticorpo específico para UCP1. [Fonte: (c, d) cortesia do Dr. Patrick Seale.]

A gotícula lipídica contém TAG e ésteres de esteroide e é revestida com uma monocamada de fosfolípidios, orientados com seus grupos cabeça voltados para o citosol. Proteínas específicas estão associadas à superfície das gotículas, incluindo a perilipina e as enzimas para síntese e quebra de TAG (Figura 17-3). O TAB representa normalmente cerca de 15% da massa de um ser humano adulto jovem e saudável. Os adipócitos são metabolicamente ativos, respondendo rapidamente a estímulos hormonais em interação metabólica com o fígado, o músculo esquelético e o coração.

Como outros tipos celulares, os adipócitos têm um metabolismo glicolítico ativo, oxidam piruvato e ácidos graxos pelo ciclo do ácido cítrico e realizam fosforilação oxidativa. Durante períodos de captação elevada de carboidratos, o tecido adiposo pode converter a glicose (via piruvato e acetil-CoA) em ácidos graxos e converter estes em TAG armazenados em grandes gotículas de gordura – embora a maior parte da síntese de ácidos graxos em seres humanos ocorra nos hepatócitos. Os adipócitos armazenam TAG provenientes do fígado (transportados no sangue como VLDL) e do trato intestinal (transportados em quilomícrons), particularmente após refeições ricas em gordura.

Quando aumenta a demanda por combustível (p. ex., entre as refeições), as lipases dos adipócitos hidrolisam os triacilgliceróis armazenados, liberando ácidos graxos livres, que podem se deslocar pela corrente sanguínea para o músculo esquelético e o coração. A liberação dos ácidos graxos dos adipócitos é aumentada pela adrenalina, que estimula a fosforilação dependente de cAMP da perilipina e, assim, dá

às lipases específicas para tri-, di- e monoacilgliceróis acesso aos triacilgliceróis na gota lipídica (ver Figura 17-3). A lipase sensível a hormônio também é estimulada por fosforilação, mas esta não é a principal causa do aumento da lipólise. A insulina contrabalança o efeito da adrenalina, reduzindo a atividade da lipase.

A degradação e a síntese de triacilgliceróis no tecido adiposo constituem um ciclo de substrato; até 70% dos ácidos graxos liberados pelas três lipases são reesterificados nos adipócitos, produzindo novamente os triacilgliceróis. Lembre-se, do Capítulo 15, de que os ciclos de substrato permitem uma regulação fina da velocidade e da direção do fluxo dos intermediários em uma via bidirecional. No tecido adiposo, o glicerol liberado pelas lipases dos adipócitos não pode ser reutilizado na síntese de triacilgliceróis, uma vez que os adipócitos não têm a glicerol-cinase. Em vez disso, o fosfato de glicerol necessário para a síntese de TAG é sintetizado a partir de piruvato pela gliconeogênese, exigindo a ação da PEP-carboxicinase citosólica (Figura 21-22).

Além de sua função central como depósito de combustível, o tecido adiposo tem um papel importante como órgão endócrino, produzindo e liberando hormônios que sinalizam o estado das reservas de energia e coordenam o metabolismo das gorduras e dos carboidratos em todo o corpo. Voltaremos a essa função na Seção 23.4, quando discutirmos a regulação hormonal da massa corporal.

Os tecidos adiposos marrom e bege são termogênicos

Nos vertebrados pequenos e nos animais que hibernam, uma proporção significativa do tecido adiposo é formada pelo **tecido adiposo marrom (TAM)**, distinto do TAB por seus adipócitos menores (20 a 40 μm de diâmetro) com formato diferente (poligonais, em vez de redondos) (Figura 23-17b, d). Como os adipócitos brancos, os adipócitos marrons armazenam triacilgliceróis, mas em várias gotículas de lipídeo menores por célula, em vez de uma única gota central. As células do TAM têm mais mitocôndrias e um suprimento mais rico de capilares e de inervação do que as células do TAB, e sua característica cor marrom é conferida pelos citocromos das mitocôndrias e pela hemoglobina nos capilares. Uma característica única dos adipócitos marrons é a produção da **proteína desacopladora 1 (UCP1)**, também chamada de termogenina (ver Figura 19-36). Essa proteína é responsável por uma das principais funções do TAM: a **termogênese**.

Nos adipócitos marrons, os ácidos graxos armazenados nas gotículas de gordura são liberados, entram nas mitocôndrias e sofrem conversão completa em CO_2 pela β -oxidação e pelo ciclo do ácido cítrico. O FADH_2 e o NADH reduzidos gerados passam seus elétrons pela cadeia respiratória para o oxigênio molecular. No TAB, os prótons bombeados para fora da mitocôndria durante a transferência de elétrons reentram na matriz por meio da ATP-sintase, e a energia dessa transferência é conservada na síntese de ATP. No TAM, a UCP1 fornece uma rota alternativa para a reentrada de prótons que não envolve a ATP-sintase. A energia do gradiente de prótons é, assim, dissipada como calor, que pode manter o corpo (principalmente o sistema nervoso e as vísceras) em sua temperatura ideal quando a temperatura ambiente é relativamente baixa.

No feto humano, a diferenciação dos fibroblastos “pré-adipócitos” em TAM começa na 20ª semana da gestação, e o

TAM representa, no nascimento, de 1 a 5% da massa corporal total. Os depósitos de gordura marrom estão localizados onde o calor gerado pela termogênese garante que os tecidos vitais – vasos sanguíneos para a cabeça, principais vasos sanguíneos abdominais e as vísceras, incluindo o pâncreas, as glândulas suprarrenais e os rins – não tenham sua temperatura reduzida quando o recém-nascido entra em um mundo de temperatura ambiente mais baixa (**Figura 23-18**).

Após o nascimento, o TAB começa a se desenvolver, e o TAM começa a desaparecer. Os seres humanos adultos jovens têm depósitos muito diminuídos de TAM, de 3% de todo o tecido adiposo no sexo masculino a 7% no sexo feminino, perfazendo menos de 0,1% da massa corporal. No entanto, os adultos apresentam um número significativo de adipócitos, distribuídos entre suas células do TAB, que podem ser convertidos pela exposição ao frio ou pela estimulação β -adrenérgica em células muito semelhantes aos

adipócitos marrons. Esses **adipócitos bege** têm várias gotículas lipídicas, são mais ricos em mitocôndrias do que os adipócitos brancos e produzem UCP1, de modo que funcionam efetivamente como geradores de calor. Os adipócitos marrom e bege produzem calor pela oxidação de seus próprios ácidos graxos, mas também absorvem e oxidam os ácidos graxos e a glicose do sangue a taxas desproporcionais à sua massa. Na verdade, a detecção de TAM por tomografia de varredura por emissão de pósitrons (*PET scan*) depende da taxa relativamente alta de captação e metabolismo da glicose (Figura 23-18b). Os seres humanos com feocromocitoma (tumores da glândula suprarrenal) produzem excesso de adrenalina e noradrenalina, e um dos efeitos é que esses hormônios estimulam o desenvolvimento de tecido adiposo bege, localizado mais ou menos como nos recém-nascidos. Na adaptação ao ambiente quente ou frio e na diferenciação normal do TAB, do TAM e do tecido adiposo bege, o fator

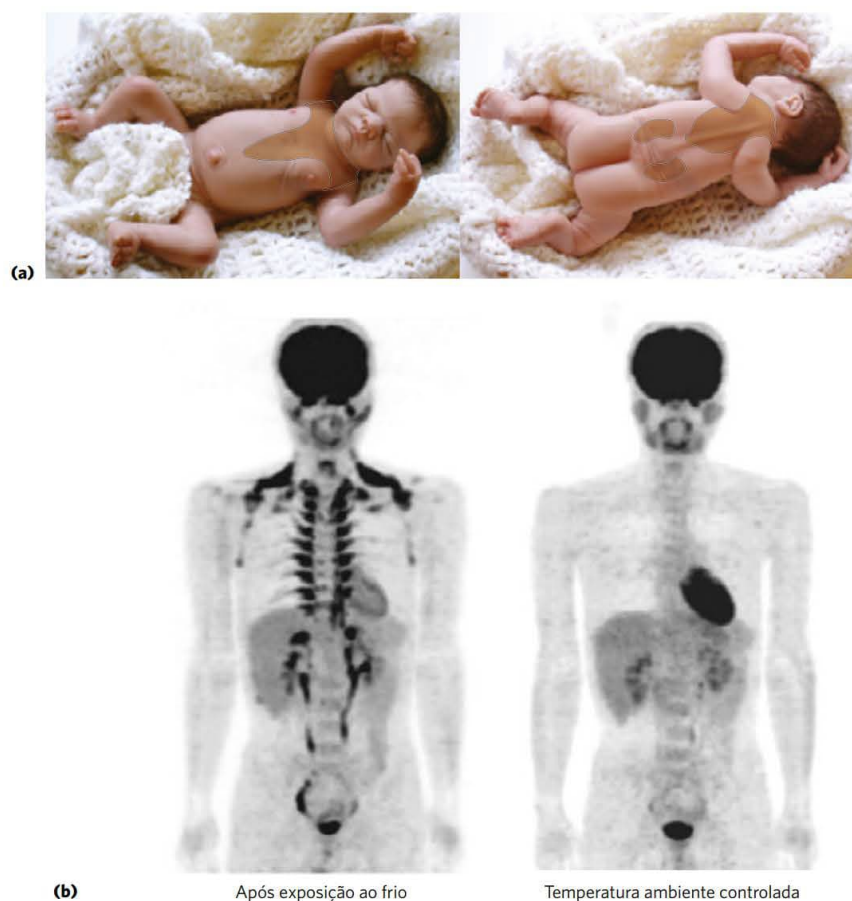


FIGURA 23-18 Tecido adiposo marrom em crianças e adultos. (a) Os bebês humanos, ao nascer, têm a gordura marrom distribuída conforme mostrado nesta figura, para proteger a coluna vertebral, os vasos sanguíneos principais e os órgãos internos. (b) A tomografia por emissão de pósitrons (PET) pode mostrar atividade metabólica em uma pessoa viva, em tempo real. As varreduras por PET permitem a visualização de glicose marcada isotopicamente em regiões localizadas do corpo. Um análogo da glicose emissora de pósitrons, 2-[^{18}F]-fluoro-2-desóxi-D-glicose (FDG), é injetado na corrente circulatória. Pouco tempo depois, uma varredura por PET mostra quanto da glicose foi absorvida por cada parte do corpo – uma medida da atividade metabólica. À esquerda, está uma varredura por PET de um homem saudável de 25 anos que jejuou por 12 horas, depois permaneceu por 1 hora em um quarto frio (19°C), com suas pernas no gelo para esfriá-lo completamente. No final de uma hora, [^{18}F]-FDG foi injetado nele, que permaneceu sob condições frias por mais uma hora. As varreduras por PET de corpo inteiro foram, então, feitas a 24°C. Como controle, o mesmo homem foi submetido ao mesmo protocolo de varredura por PET duas semanas mais tarde, mas, desta vez, após 2 horas a 27°C, em vez de refrigeração (à direita). A marcação intensa do cérebro e do coração mostra altas taxas de captação de glicose; a marcação nos rins e na bexiga indica a depuração do FDG. Na varredura após o resfriamento (à esquerda), [^{18}F]-FDG marca TAM na região acima da clavícula e ao longo das vértebras. [Fontes: (a) Adam Steinberg. (b) Reproduzida, com permissão, da American Diabetes Association, de M. Saito et al., *Diabetes* 58:1526, 2009, Fig. 1; permissão obtida através do Copyright Clearance Center, Inc.]

de transcrição nuclear PPAR γ (descrito mais adiante neste capítulo) desempenha um papel central. Como observamos anteriormente, o hormônio peptídico irisina, produzido no músculo pelo exercício, desencadeia o desenvolvimento do tecido adiposo bege, que continua a queimar combustível muito tempo depois do término do exercício.

Os músculos usam ATP para trabalho mecânico

O metabolismo nas células musculares esqueléticas – **miócitos** – é especializado para gerar ATP como fonte imediata de energia para a contração. Além disso, o músculo esquelético está adaptado para fazer seu trabalho mecânico de forma intermitente, de acordo com a demanda. Às vezes, o músculo esquelético precisa trabalhar na sua capacidade máxima por um tempo curto, como em corridas de 100 metros; outras vezes, é necessário um esforço mais longo, como em maratonas ou trabalhos físicos mais prolongados.

Existem duas classes gerais de tecido muscular, que diferem no papel fisiológico e na utilização de combustível. O **músculo de contração lenta**, também chamado de músculo vermelho, proporciona tensão relativamente baixa, mas é altamente resistente à fadiga. Ele produz ATP pelo processo de fosforilação oxidativa, relativamente lento, mas estável. O músculo vermelho é muito rico em mitocôndrias e é irrigado por redes muito densas de vasos sanguíneos, que fornecem o oxigênio essencial para a produção de ATP. O **músculo de contração rápida**, ou músculo branco, tem menos mitocôndrias e um suprimento menor de vasos sanguíneos do que o músculo vermelho, mas pode desenvolver grande tensão e o faz mais rapidamente. O músculo branco entra em fadiga com mais rapidez, pois, quando em atividade, usa ATP mais rapidamente do que pode repor. A proporção individual entre os músculos branco e vermelho apresenta um componente genético, e a resistência do músculo de contração rápida pode ser aumentada com treinamento.

O músculo esquelético poder usar ácidos graxos livres, corpos cetônicos ou glicose como combustíveis, dependendo do grau de atividade muscular (**Figura 23-19**). No

músculo em repouso, os principais combustíveis são ácidos graxos livres do tecido adiposo e corpos cetônicos do fígado. Estes são oxidados e degradados para produzir acetil-CoA, que entra no ciclo do ácido cítrico, resultando na energia para a síntese de ATP pela fosforilação oxidativa. Os músculos moderadamente ativos usam a glicose sanguínea, além dos ácidos graxos livres e dos corpos cetônicos. A glicose é fosforilada, sendo, então, degradada pela glicólise a piruvato, o qual é convertido em acetil-CoA e oxidado pelo ciclo do ácido cítrico e pela fosforilação oxidativa.

Nos músculos de contração rápida em atividade máxima, a demanda por ATP é tão grande que o fluxo sanguíneo não consegue fornecer O₂ e combustíveis com a rapidez necessária para gerar uma quantidade suficiente de ATP somente pela respiração aeróbica. Nessas condições, o glicogênio armazenado no músculo é degradado a lactato por fermentação (p. 537). Cada unidade de glicose degradada rende três ATP, uma vez que a fosforólise do glicogênio produz glicose-6-fosfato (via glicose-1-fosfato), poupando o ATP normalmente consumido na reação da hexocinase. A fermentação em ácido láctico responde, assim, mais rapidamente do que a fosforilação oxidativa a uma necessidade aumentada de ATP, suplementando sua produção basal de ATP pela oxidação aeróbica de outros combustíveis no ciclo do ácido cítrico e na cadeia respiratória. O uso da glicose sanguínea e do glicogênio do músculo como combustíveis para a atividade muscular é muito incrementado pela secreção de adrenalina, que estimula tanto a liberação de glicose a partir do glicogênio hepático como a degradação de glicogênio no tecido muscular. (A adrenalina controla a resposta de “luta ou fuga”, discutida em mais detalhes a seguir.)

A quantidade relativamente pequena de glicogênio (cerca de 1% do peso total do músculo esquelético) limita a quantidade de energia glicolítica disponível durante o esforço. Além disso, o acúmulo de lactato e a consequente redução do pH nos músculos em atividade máxima reduzem sua eficiência. O músculo esquelético, contudo, tem outra fonte de ATP, a fosfocreatina (10 a 30 mM), que regenera ATP rapidamente a partir de ADP pela reação da creatina-cinase:

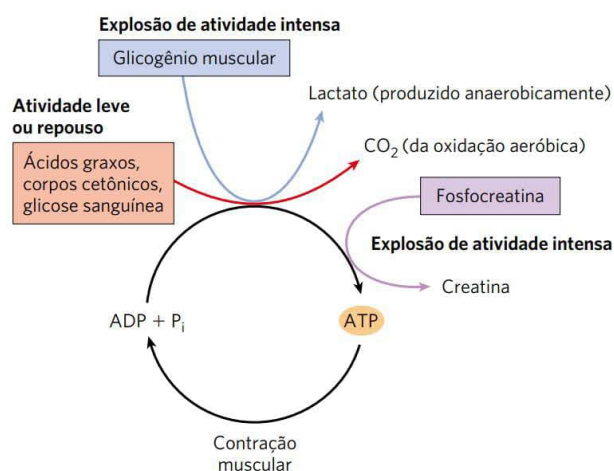
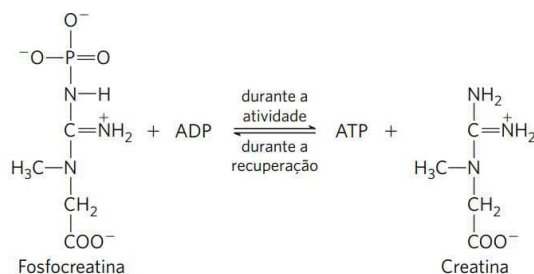


FIGURA 23-19 Fontes de energia para a contração muscular. Diferentes combustíveis são usados para a síntese de ATP durante períodos de atividade intensa e durante atividade leve ou repouso. A fosfocreatina fornece ATP rapidamente.



Durante períodos de contração ativa e glicólise, esta reação ocorre predominantemente no sentido da síntese de ATP; durante a recuperação do esforço, a mesma enzima sintetiza novamente a fosfocreatina a partir de creatina e ATP. Devido aos níveis relativamente altos de ATP e de fosfocreatina muscular, estes compostos podem ser detectados no músculo isolado, em tempo real, pela espectroscopia de RNM (**Figura 23-20**). A creatina serve para enviar equivalentes de ATP da mitocôndria para locais de consumo de ATP e pode ser o fator limitante no desenvolvimento de novo tecido muscular (Quadro 23-2).

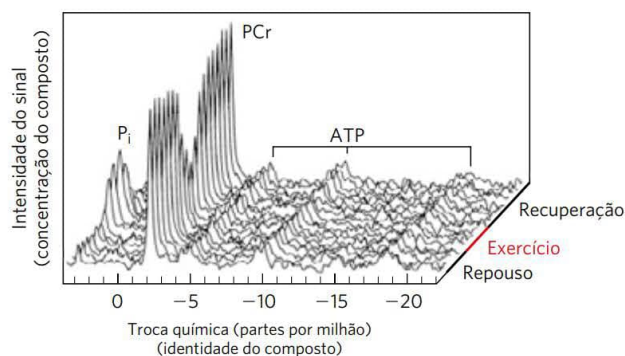


FIGURA 23-20 A fosfocreatina tampona a concentração de ATP durante o exercício. Uma representação gráfica de um espectro de ressonância magnética (do ^{31}P) mostra fosfato inorgânico (P_i), fosfocreatina (PCr) e ATP (cada um dos seus três fosfatos emite um sinal). A série de curvas representa a passagem do tempo, de um período de repouso para um de exercício, e, então, a recuperação. Observe que o sinal do ATP quase não se altera durante o exercício, mantido alto pela respiração contínua e pelo reservatório de fosfocreatina, que diminui durante o exercício. Durante a recuperação, quando a produção de ATP pelo catabolismo é maior do que a sua utilização pelo músculo (agora em repouso), o reservatório de fosfocreatina é repostado. [Fonte: dados obtidos de M. L. Blei, K. E. Conley e M. J. Kushmerick, *J. Physiol.* 465:203, 1993, Fig. 4.]

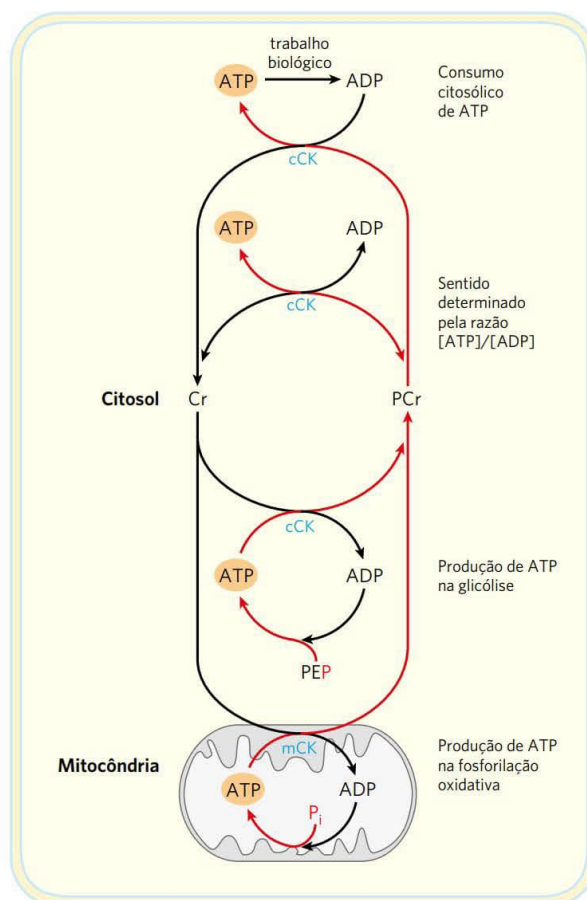
QUADRO 23-2 Creatina e creatina-cinase: inestimáveis auxiliares do diagnóstico e amigas dos fisiculturistas

Os tecidos animais que têm uma necessidade de ATP elevada e flutuante, principalmente músculo esquelético, músculo cardíaco e cérebro, contêm várias isoenzimas da creatina-cinase. Uma isoenzima citoplasmática está presente em regiões de alto consumo de ATP (p. ex., miofibrilas e retículo sarcoplasmático). Pela conversão do ADP produzido durante períodos de alto consumo de ATP de volta a ATP, essa isoenzima previne o acúmulo de ADP em concentrações que poderiam inibir, pela ação das massas, as enzimas que utilizam ATP. Outra isoenzima da creatina-cinase está localizada em regiões de contato entre as membranas interna e externa da mitocôndria. Essa isoenzima mitocondrial (mCK) provavelmente serve para enviar equivalentes de ATP produzidos na mitocôndria para os sítios citoplasmáticos de utilização do ATP (Figura Q-1). A substância que se difunde da mitocôndria para as atividades que consomem ATP no citosol é o fosfato de creatina, não o ATP. A isoenzima mCK está colocalizada com o transportador de nucleotídeos de adenina (na membrana mitocondrial interna) e com a porina (na membrana mitocondrial externa), o que sugere que esses três componentes possam funcionar juntos no transporte para o citosol do ATP formado na mitocôndria.

Em camundongos nocaute sem a isoenzima mitocondrial, os miócitos compensam pela produção de mais mitocôndrias, intimamente associadas com as miofibrilas e o retículo sarcoplasmático, o que permite a difusão rápida do ATP mitocondrial para os sítios de utilização. Todavia, esses camundongos têm capacidade reduzida para correr, indicando um defeito em algum aspecto do metabolismo de suprimento de energia.

FIGURA Q-1 A creatina-cinase mitocondrial (mCK) transfere um grupo fosforila do ATP para a creatina (Cr) para formar a fosfocreatina (PCr), que se difunde para locais de consumo de ATP; nesses locais, a creatina-cinase citosólica (cCK) transfere o grupo fosforila para formar ATP. A CK citosólica também pode utilizar o ATP produzido na glicólise para sintetizar PCr. Durante os períodos de baixa demanda de ATP, os reservatórios de ATP e de PCr são abastecidos em preparação para o próximo período de demanda intensa de ATP. No músculo em repouso, a concentração de PCr é 2 a 3 vezes maior que a de ATP, protegendo a célula contra a depleção rápida do ATP durante curtas explosões de demanda por ATP. [Fonte: informação de U. Schlattner et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1762:164, 2006, Fig. 1.]


A creatina e a fosfocreatina degradam-se espontaneamente em creatinina (Figura Q-2). Para manter altos níveis de creatina, essas perdas têm de ser compensadas, seja pela creatina da dieta, obtida principalmente da carne (músculo) e de produtos lácteos, ou pela síntese *de novo* a partir de glicina, arginina e metionina (Figura 22-28), que ocorre principalmente no fígado e nos rins. A síntese *de novo* de creatina é o principal consumidor desses aminoácidos, particularmente nos veganos, para os quais essa é a única fonte de creatina;



Após um período de atividade muscular intensa, a pessoa continua a respirar intensamente por algum tempo, usando muito O_2 extra na fosforilação oxidativa no fígado. O ATP produzido é usado para a gliconeogênese (no fígado) a partir do lactato, que foi transportado dos músculos pelo sangue. A glicose assim formada retorna aos músculos para repor seus estoques de glicogênio, completando o ciclo de Cori (**Figura 23-21**; ver também Quadro 15-4).

O músculo esquelético em contração ativa gera calor como um subproduto do acoplamento imperfeito da energia química do ATP com o trabalho mecânico da contração. Essa produção de calor pode ser utilizada quando a tempe-

ratura ambiente estiver baixa: o músculo esquelético realiza a **termogênese com calafrio**, uma contração muscular repetida rapidamente que produz calor, mas pouco movimento, ajudando a manter o corpo na sua temperatura recomendada de $37^\circ C$.

 O músculo cardíaco difere do músculo esquelético por ter atividade contínua, em um ritmo regular de contração e relaxamento, e por ter um metabolismo completamente aeróbico o tempo todo. As mitocôndrias são muito mais abundantes no músculo cardíaco do que no esquelético, ocupando quase a metade do volume das células (**Figura 23-22**). O coração usa principalmente ácidos

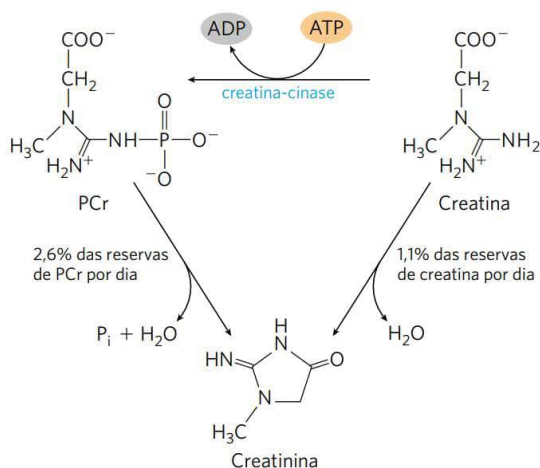



FIGURA Q-2 A formação espontânea (não enzimática) de creatinina a partir de fosfocreatina ou creatina consome um percentual da creatina total do corpo por dia, a qual deve ser reposta pela biossíntese ou pela dieta.

as plantas não apresentam creatina. O tecido muscular tem um sistema específico para absorver a creatina (exportada pelo fígado ou pelo rim) do sangue, contra um considerável gradiente de concentração. A absorção eficiente de creatina da dieta requer exercício contínuo; sem exercício, a suplementação de creatina é de pouco valor.

 O músculo cardíaco tem uma única isoenzima da creatina-quinase (a isoenzima MB), normalmente não encontrada no sangue, sendo liberada pelo músculo lesado por um infarto do miocárdio. O nível sanguíneo da MB começa a subir dentro de 2 horas após o ataque, alcança um pico entre 12 e 36 horas e retorna aos níveis normais entre 3 e 5 dias após o ataque. Portanto, a medida da MB no sangue confirma o diagnóstico de um infarto do miocárdio e indica, aproximadamente, quando ele ocorreu.

Crianças com defeitos congênitos nas enzimas de síntese ou de captação da creatina sofrem de incapacidade intelectual grave e convulsões. Elas apresentam níveis muito reduzidos de creatina no cérebro, conforme me-



FIGURA Q-3 Muitos fisiculturistas tomam suplementos de creatina para fornecer fosfocreatina para os novos tecidos musculares. [Fonte: Steve Williams Photo/Getty Images.]

dido por RMN (ver Figura 23-20). A suplementação de creatina aumenta as concentrações de creatina e de fosfocreatina no cérebro e proporciona uma melhora parcial dos sintomas.

No rim saudável, a creatinina proveniente da degradação da creatina é eliminada do sangue para a urina de forma eficiente. Quando a função renal está comprometida, os níveis de creatinina no sangue aumentam acima da faixa de normalidade de 0,8 a 1,4 mg/dL. Creatinina sanguínea elevada está associada com deficiência renal no diabetes e em outras condições nas quais a função renal está temporária ou permanentemente comprometida. A eliminação renal da creatinina varia levemente com a idade, a raça e o gênero, de forma que a correção do cálculo por esses fatores produz uma medida mais sensível da extensão da função renal, a **taxa de filtração glomerular (GFR)**. ■

Os fisiculturistas que estão formando massa muscular têm uma grande necessidade de creatina e comumente consomem suplementos com creatina de até 20 g por dia por poucos dias, seguida de doses de manutenção mais baixas. A combinação de exercício e suplementação de creatina aumenta a massa muscular (**Figura Q-3**) e melhora o desempenho em trabalhos de alta intensidade e curta duração.

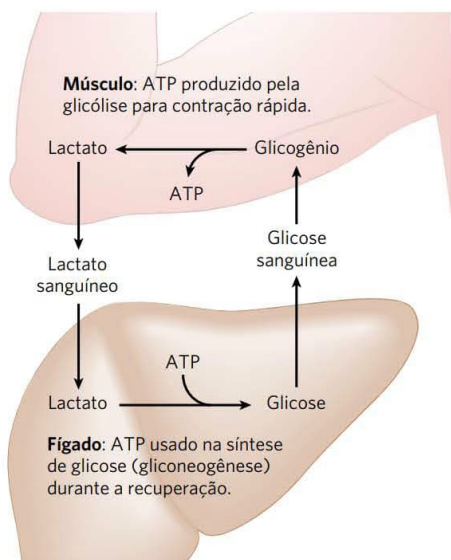


FIGURA 23-21 Cooperação metabólica entre o músculo esquelético e o fígado: o ciclo de Cori. Músculos extremamente ativos usam o glicogênio como fonte de energia, gerando lactato via glicólise. Durante a recuperação, parte do lactato é transportado para o fígado e convertido em glicose pela gliconeogênese. A glicose é liberada no sangue e retorna ao músculo para repor seus estoques de glicogênio. A via global, glicose → lactato → glicose, constitui o ciclo de Cori.

graxos livres como fonte de energia, mas também alguma glicose e corpos cetônicos retirados do sangue; esses combustíveis são oxidados aerobicamente para gerar ATP. Como o músculo esquelético, o músculo cardíaco não armazena grandes quantidades de lipídeos ou glicogênio. Ele tem pequenas quantidades de energia de reserva na forma de fosfocreatina, o suficiente para poucos segundos de contração. Uma vez que o coração normalmente é aeróbico e obtém

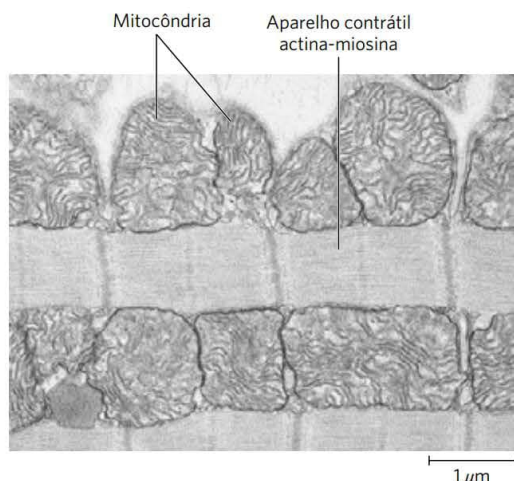


FIGURA 23-22 Micrografia eletrônica do músculo cardíaco. Nas mitocôndrias abundantes no tecido cardíaco, o piruvato (procedente da glicose), os ácidos graxos e os corpos cetônicos são oxidados para propiciar a síntese de ATP. Esse metabolismo aeróbico constante permite que o coração humano bombeie o sangue a uma taxa de aproximadamente 6 L/min, ou cerca de 350 L/h, o que equivale a 200×10^6 L de sangue ao longo de 70 anos. [Fonte: D. W. Fawcett/Science Source.]

sua energia a partir da fosforilação oxidativa, a falha em levar O_2 à determinada região do músculo cardíaco quando os vasos sanguíneos estão bloqueados por depósitos lipídicos (aterosclerose) ou coágulos sanguíneos (trombose coronariana) pode causar a morte do tecido cardíaco nessa região. Isso é o que acontece no infarto do miocárdio, mais comumente conhecido como ataque cardíaco. ■

O cérebro usa a energia para a transmissão de impulsos elétricos

O metabolismo do cérebro é extraordinário em vários aspectos. Os neurônios do cérebro dos mamíferos adultos normalmente usam somente glicose como combustível (**Figura 23-23**). (Os astrócitos, outro tipo celular importante no cérebro, podem oxidar ácidos graxos.) O cérebro, que constitui cerca de 2% da massa corporal total, tem um metabolismo respiratório muito ativo (**Figura 23-18**), sendo que mais de 90% do ATP produzido nos neurônios vem da fosforilação oxidativa. O cérebro usa O_2 a uma taxa razoavelmente constante, representando quase 20% do total de O_2 consumido pelo corpo em repouso. Uma vez que o cérebro tem muito pouco glicogênio, ele depende constantemente da glicose sanguínea. A queda significativa da glicose sanguínea abaixo de um nível crítico, mesmo que por um curto período, pode resultar em mudanças graves, e, às vezes, irreversíveis, na função cerebral.

Embora os neurônios do cérebro não possam usar diretamente ácidos graxos livres ou lipídeos do sangue como combustíveis, eles podem, quando necessário, obter até 60% de sua necessidade energética a partir da oxidação do β -hidroxibutirato (um corpo cetônico), formado no fígado a partir de ácidos graxos. A capacidade do cérebro de oxidar β -hidroxibutirato via acetil-CoA torna-se importante durante o jejum prolongado ou a inanção, depois da degradação total do glicogênio hepático, pois permite que o cérebro use a gordura corporal como fonte de energia. Isso poupa proteínas musculares – até que se tornem a fonte final de glicose do cérebro (via gliconeogênese no fígado) durante a inanção grave.

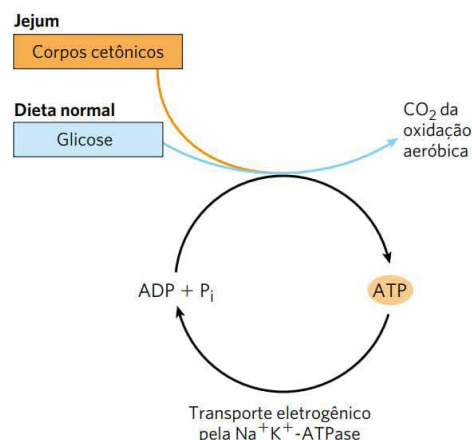


FIGURA 23-23 Os combustíveis que suprem o cérebro com ATP. A fonte de energia usada pelo cérebro varia com o estado nutricional. O corpo cetônico usado durante o jejum é o β -hidroxibutirato. O transporte eletrogênico pela $Na^+K^+-ATPase$ mantém o potencial transmembrana essencial para a transferência de informação entre neurônios.

Nos neurônios, é necessária energia para criar e manter o potencial elétrico através da membrana plasmática. A membrana tem um transportador eletrogênico do tipo antiporte dependente de ATP, a $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$, que bombeia simultaneamente 2 íons K^+ para dentro e 3 íons Na^+ para fora do neurônio (ver Figura 11-36). O potencial de membrana resultante altera-se transitoriamente quando um sinal elétrico (potencial de ação) percorre o neurônio de uma extremidade à outra (ver Figura 12-29). Os potenciais de ação são os mecanismos essenciais de transferência de informação no sistema nervoso, de forma que a depleção de ATP nos neurônios tem efeitos desastrosos sobre todas as atividades coordenadas pela sinalização neuronal.

O sangue transporta oxigênio, metabólitos e hormônios

O sangue medeia as interações metabólicas entre todos os tecidos. Ele transporta nutrientes do intestino delgado para o fígado, e do fígado e do tecido adiposo para outros órgãos; também transporta os produtos de excreção dos tecidos extra-hepáticos para o fígado para processamento e para os rins para eliminação. O oxigênio desloca-se na corrente sanguínea dos pulmões para os tecidos, e o CO_2 gerado pela respiração tecidual retorna pela corrente sanguínea para os pulmões para ser expelido. O sangue também carrega sinais hormonais de um tecido para outro. No seu papel de transportador de sinais, o sistema circulatório lembra o sistema nervoso; ambos regulam e integram as atividades dos diferentes órgãos.

Um ser humano adulto médio tem de 5 a 6 L de sangue. Quase a metade desse volume é composta por três tipos de células sanguíneas (**Figura 23-24**): os **eritrócitos** (células vermelhas), cheios de hemoglobina e especializados no transporte de O_2 e CO_2 ; números muito menores de **leucócitos** (células brancas) de vários tipos (incluindo os **linfócitos**, também encontrados nos tecidos linfáticos), fundamentais para o sistema imune defender o organismo contra infecções; e as **plaquetas** (fragmentos de células), que ajudam a mediar a coagulação sanguínea. A porção líquida é o **plasma sanguíneo**, com 90% de água e 10% de solutos. Dissolvidos ou suspensos no plasma estão muitas proteínas, lipoproteínas, nutrientes, metabólitos, produtos residuais, íons inorgânicos e hormônios. Mais de 70% dos sólidos plasmáticos são **proteínas plasmáticas**, principalmente imunoglobulinas (anticorpos circulantes), albumina sérica, apolipoproteínas (para transporte lipídico), transferrina (para transporte de ferro) e proteínas coagulantes, como fibrinogênio e protrombina.

Os íons e os solutos de baixo peso molecular do plasma sanguíneo não são componentes fixos, mas estão em fluxo constante entre o sangue e os vários tecidos. A absorção de íons inorgânicos provenientes da dieta, que são os eletrólitos predominantes do sangue e do citosol (Na^+ , K^+ e Ca^{2+}) é, em geral, contrabalançada pela sua excreção na urina. Para muitos componentes do sangue, é alcançado algo próximo a um estado de equilíbrio dinâmico: a concentração do componente é pouco alterada, embora ocorra um fluxo contínuo entre o sistema digestório, o sangue e a urina. Os níveis plasmáticos de Na^+ , K^+ e Ca^{2+} permanecem próximos de 140, 5 e 2,5 mM, respectivamente, com pequena variação em resposta ao que foi recebido da dieta. Qualquer alteração significativa desses valores resulta em doença grave ou morte. Os rins têm um papel especialmente importante na manutenção

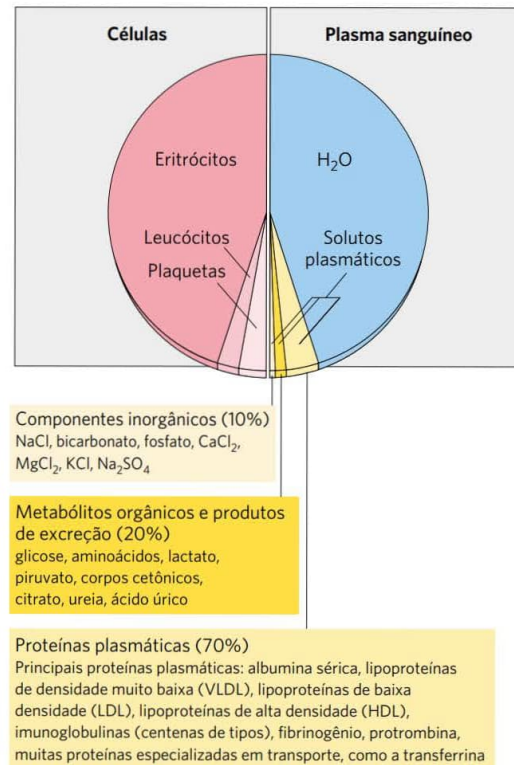


FIGURA 23-24 A composição do sangue (por peso). O sangue total pode ser separado por centrifugação em plasma e células. Cerca de 10% do plasma sanguíneo são solutos, cerca de 10% destes consistem em sais inorgânicos, 20% de pequenas moléculas orgânicas e 70% de proteínas plasmáticas. Os principais componentes estão listados aqui. O sangue tem muitas outras substâncias, frequentemente em quantidades muito pequenas. Estas incluem outros metabólitos, enzimas, hormônios, vitaminas, elementos-traço e pigmentos biliares. A medida das concentrações dos componentes no plasma sanguíneo é importante no diagnóstico e no tratamento de muitas doenças.

do equilíbrio iônico pela filtração seletiva dos produtos de excreção e do excesso de íons do sangue, ao mesmo tempo em que evitam a perda de nutrientes essenciais e de íons.

O eritrócito humano perde seu núcleo e suas mitocôndrias durante a diferenciação. Assim, ele depende apenas da glicólise para a produção de ATP. O lactato produzido pela glicólise retorna ao fígado, onde a gliconeogênese o converte em glicose, que será armazenada como glicogênio ou circulará novamente até os tecidos periféricos. O eritrócito tem constante acesso à glicose sanguínea.



A concentração da glicose no plasma está sujeita a uma estreita regulação. Anteriormente, foi abordada a necessidade constante do cérebro por glicose e o papel do fígado na manutenção da glicose sanguínea na faixa de normalidade de 60 a 90 mg/100 mL de sangue total (~ 4,5 mM). (Uma vez que os eritrócitos compõem uma fração significativa do volume sanguíneo, sua remoção por centrifugação deixa um fluido sobrenadante, o plasma, contendo a “glicose sanguínea” em um volume menor. Para converter a concentração sanguínea da glicose em concentração plasmática, multiplique a concentração sanguínea de glicose por 1,14.) Quando a glicose sanguínea em seres humanos diminui para 40 mg/100 mL (condição hipoglicêmica), a pessoa sente desconforto e

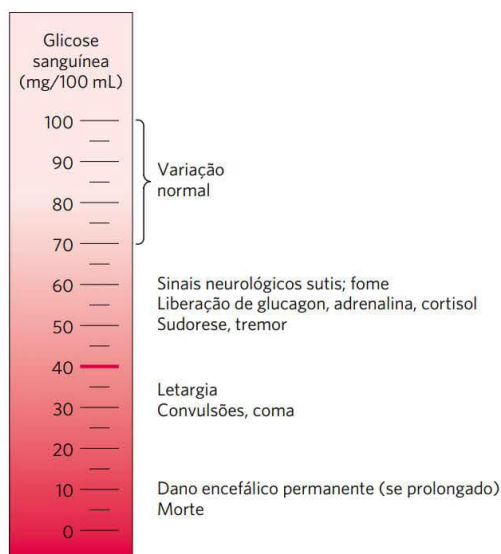


FIGURA 23-25 Efeitos fisiológicos do nível baixo de glicose sanguínea em seres humanos. Os níveis de glicose sanguínea de 40 mg/100 mL ou abaixo constituem hipoglicemia grave.

confusão mental (**Figura 23-25**); reduções adicionais levam ao coma, a convulsões e, em casos de hipoglicemia extrema, à morte. Portanto, a manutenção da concentração normal de glicose no sangue é uma prioridade e uma variedade de mecanismos reguladores tem evoluído para alcançar esse objetivo. Entre os reguladores mais importantes da glicose sanguínea estão os hormônios insulina, glucagon e adrenalina, conforme será discutido na próxima seção. ■

RESUMO 23.2 Metabolismo específico para cada tecido: a divisão de trabalho

- Nos mamíferos, existe uma divisão de trabalho metabólico entre tecidos e órgãos especializados. O fígado é o órgão central de processamento e distribuição de nutrientes. Os açúcares e os aminoácidos produzidos na digestão atravessam o epitélio intestinal e entram no sangue, que os transporta para o fígado. Alguns triacilgliceróis derivados dos lipídeos ingeridos também fazem seu caminho para o fígado, onde os ácidos graxos constituintes são usados em uma grande variedade de processos.
- A glicose-6-fosfato é o intermediário-chave no metabolismo dos carboidratos. Ela pode ser polimerizada em glicogênio, desfosforilada para fornecer glicose sanguínea ou convertida em ácidos graxos via acetil-CoA. Ela também pode sofrer oxidação na glicólise, no ciclo do ácido cítrico e na cadeia respiratória para gerar ATP, ou entrar na via das pentoses-fosfato, produzindo pentoses e NADPH.
- Os aminoácidos são utilizados para sintetizar proteínas hepáticas e plasmáticas, ou seus esqueletos carbonados são convertidos em glicose e glicogênio pela gliconeogênese; a amônia formada pela desaminação é convertida em ureia.
- O fígado converte os ácidos graxos em triacilgliceróis, fosfolipídeos ou colesterol e seus ésteres, que são transportados como lipoproteínas plasmáticas para o armazenamento no tecido adiposo. Os ácidos graxos também

podem ser oxidados para gerar ATP ou para formar corpos cetônicos, que se difundem para outros tecidos.

- O tecido adiposo branco armazena grandes reservas de triacilgliceróis e os libera no sangue em resposta à adrenalina ou ao glucagon. O tecido adiposo marrom é especializado na termogênese, o resultado da oxidação dos ácidos graxos em mitocôndrias desacopladas. O tecido adiposo bege expande-se em resposta à temperatura fria e à estimulação pela adrenalina. Como no tecido adiposo marrom, as mitocôndrias do tecido adiposo bege têm proteína desacopladora e são especializadas para a termogênese.
- O músculo esquelético é especializado na produção e no uso do ATP para trabalho mecânico. Durante atividade muscular baixa a moderada, a oxidação dos ácidos graxos e da glicose é a primeira fonte de ATP. Durante a atividade muscular extenuante, o glicogênio é o combustível básico, produzindo ATP pela fermentação láctica. Durante a recuperação, o lactato é reconvertido (pela gliconeogênese) em glicose e glicogênio no fígado para ser usado na reposição dos estoques de glicogênio muscular. A fosfocreatina é uma fonte imediata de ATP durante a contração ativa.
- O músculo cardíaco obtém praticamente todo o seu ATP da fosforilação oxidativa, com os ácidos graxos como o principal combustível.
- Os neurônios do cérebro usam somente glicose e β -hidroxibutirato como combustíveis, sendo que o último é importante durante o jejum ou a inanição. O cérebro utiliza a maior parte do seu ATP para o transporte ativo de Na^+ e K^+ para manter o potencial elétrico através da membrana neuronal.
- O sangue transfere nutrientes, produtos de excreção e sinais hormonais entre os tecidos e os órgãos. Isso é realizado por células (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) e pelo líquido rico em eletrólitos (plasma) que contém muitas proteínas.

23.3 Regulação hormonal do metabolismo energético

Os ajustes feitos minuto a minuto que mantêm a concentração de glicose sanguínea em cerca de 4,5 mM envolvem as ações combinadas da insulina, do glucagon, da adrenalina e do cortisol sobre os processos metabólicos em muitos tecidos corporais, sobretudo no fígado, no músculo e no tecido adiposo. A insulina sinaliza para esses tecidos que a glicose sanguínea está mais alta do que o necessário; como resultado, as células captam o excesso de glicose do sangue e o convertem em glicogênio e triacilgliceróis para armazenamento. O glucagon sinaliza que a glicose sanguínea está muito baixa e os tecidos respondem, produzindo glicose pela degradação do glicogênio, pela gliconeogênese (no fígado) e pela oxidação de gorduras para reduzir a necessidade da glicose. A adrenalina é liberada no sangue para preparar os músculos, os pulmões e o coração para um grande aumento de atividade. O cortisol é responsável por mediar a resposta corporal a fatores de estresse de longa duração. Essas regulações hormonais serão discutidas no contexto de três estados metabólicos normais – alimentado, em jejum e em inanição – e serão vistas as consequências metabólicas

TABELA 23-4 Efeitos da insulina sobre a glicose sanguínea: captação de glicose pelas células e armazenamento como triacilgliceróis e glicogênio

Efeito metabólico	Enzima-alvo
↑ Captação de glicose (músculo, tecido adiposo)	↑ Transportador de glicose (GLUT4)
↑ Captação de glicose (fígado)	↑ Glicocinase (aumento de expressão)
↑ Síntese de glicogênio (fígado, músculo)	↑ Glicogênio-sintase
↓ Degradação de glicogênio (fígado, músculo)	↓ Glicogênio-fosforilase
↑ Glicólise, produção de acetil-CoA (fígado, músculo)	↑ PFK-1 (pela PFK-2) ↑ Complexo piruvato-desidrogenase
↑ Síntese de ácidos graxos (fígado)	↑ Acetil-CoA-carboxilase
↑ Síntese de triacilglicerol (tecido adiposo)	↑ Lipase lipoproteica

cas do diabetes melito, doença que resulta de alterações nas vias de sinalização que controlam o metabolismo da glicose.

A insulina opõe-se a níveis altos de glicose sanguínea

Agindo por meio de receptores na membrana plasmática (ver Figuras 12-19 e 12-20), a insulina estimula a captação da glicose pelos músculos e pelo tecido adiposo

(Tabela 23-4), onde a glicose é convertida em glicose-6-fosfato. No fígado, a insulina também ativa a glicogênio-sintase e inativa a glicogênio-fosforilase, de modo que grande parte da glicose-6-fosfato é canalizada para formar glicogênio.

A insulina também estimula o armazenamento do excesso de combustível no tecido adiposo na forma de gordura (Figura 23-26). No fígado, a insulina ativa a oxidação da

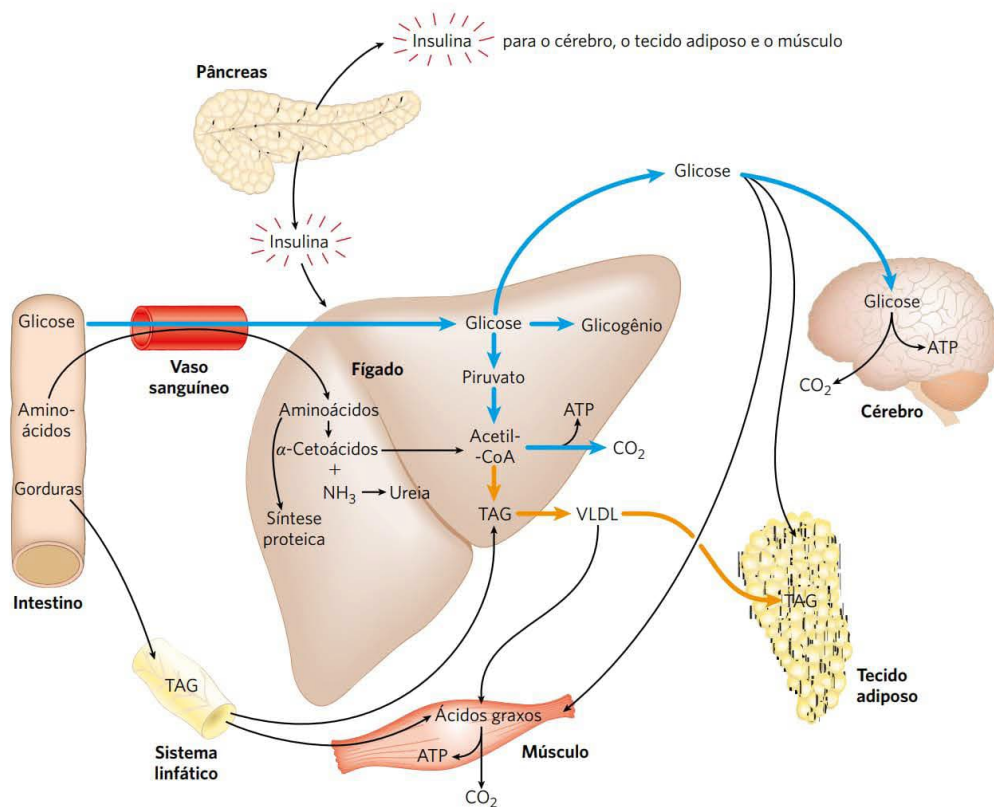


FIGURA 23-26 O estado alimentado: o fígado lipogênico. Imediatamente após uma refeição rica em calorias, a glicose, os ácidos graxos e os aminoácidos entram no fígado. Setas azuis seguem o caminho da glicose; setas cor de laranja seguem o caminho dos lipídeos. A insulina, liberada em resposta à alta concentração sanguínea de glicose, estimula a captação de glicose pelos tecidos. Parte da glicose é exportada para o cérebro para suas necessidades energéticas e parte para os tecidos adiposo e muscular. No fígado, o excesso de glicose é oxidado a acetil-CoA, a qual é usada para síntese de triacilgliceróis para exportação para o tecido adiposo e muscular. O NADPH necessário para a síntese de lipídeos é obtido pela oxidação da glicose na via das pentoses-fosfato. O excesso de aminoácidos é convertido em piruvato e acetil-CoA, também usados para a síntese de lipídeos. As gorduras da dieta deslocam-se do intestino na forma de quilomícrons, via sistema linfático, para o fígado, o músculo e o tecido adiposo.

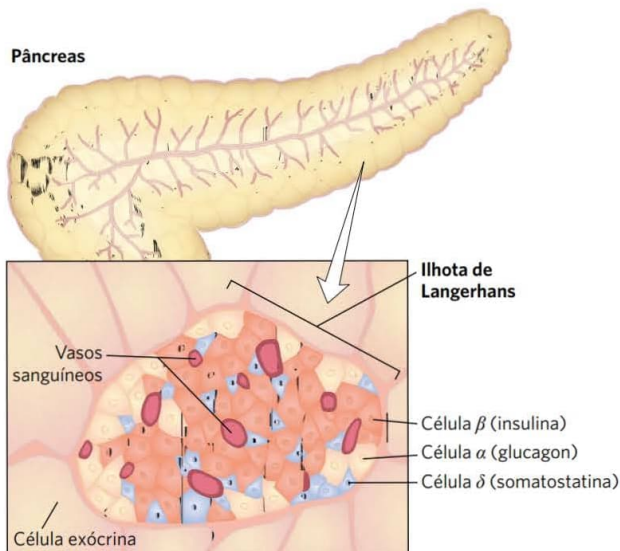


FIGURA 23-27 O sistema endócrino do pâncreas. O pâncreas tem células exócrinas (ver Figura 18-3b), que secretam enzimas digestórias na forma de zimogênios, e grupos de células endócrinas, as ilhotas de Langerhans. As ilhotas contêm células α , β e δ (também conhecidas como células A, B e D, respectivamente), cada tipo celular secreta um hormônio peptídico específico.

glicose-6-fosfato em piruvato pela glicólise e a oxidação do piruvato em acetil-CoA. O excesso de acetil-CoA não necessário para a produção de energia é usado para a síntese de ácidos graxos, e os ácidos graxos são exportados do fígado para o tecido adiposo na forma de TAG das lipoproteínas do

plasma (VLDL; ver Figura 21-40). A insulina estimula a síntese de TAG nos adipócitos, a partir de ácidos graxos liberados dos TAG de VLDL. Esses ácidos graxos são, em última análise, derivados do excesso de glicose captada do sangue pelo fígado. Em resumo, o efeito da insulina é favorecer a conversão do excesso de glicose sanguínea em duas formas de armazenamento: glicogênio (no fígado e no músculo) e triacilgliceróis (no tecido adiposo).

Além de agir diretamente no músculo e no fígado, mudando seu metabolismo de carboidratos e gorduras, a insulina pode agir no cérebro, sinalizando indiretamente para esses tecidos, conforme descrito mais adiante.

As células β -pancreáticas secretam insulina em resposta a alterações na glicose sanguínea

Quando a glicose entra na corrente sanguínea a partir do intestino após uma refeição rica em carboidratos, a quantidade aumentada de glicose no sangue provoca um aumento na secreção de insulina (e uma redução na secreção do glucagon) pelo pâncreas. A liberação de insulina é regulada basicamente pelo nível de glicose sanguínea que irriga o pâncreas. Os hormônios peptídicos insulina, glucagon e somatostatina são produzidos por agrupamentos de células pancreáticas especializadas, as ilhotas de Langerhans (**Figura 23-27**). Cada tipo celular das ilhotas produz um único hormônio: células α produzem glucagon; células β , insulina; e células δ , somatostatina.

Conforme mostrado na **Figura 23-28**, quando a glicose sanguínea aumenta, ① os transportadores GLUT2 carregam a glicose para dentro das células β , onde ela é imediatamente convertida em glicose-6-fosfato pela glicocinase e entra na glicólise. Com a taxa de catabolismo da

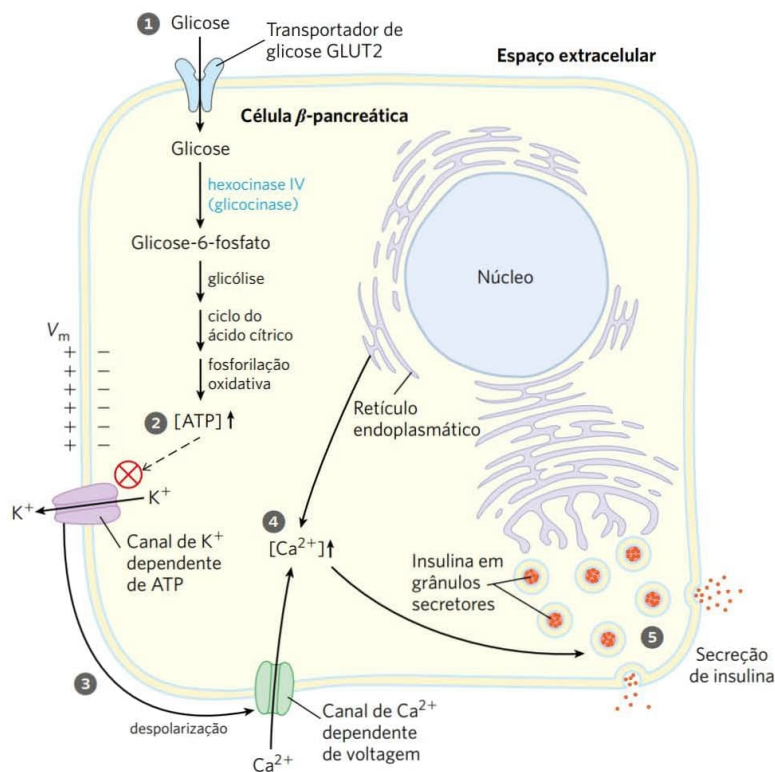


FIGURA 23-28 Secreção de insulina pelas células β -pancreáticas por meio da regulação de glicose. Quando o nível sanguíneo de glicose é alto, o metabolismo ativo de glicose nas células β aumenta a [ATP] intracelular, fechando os canais de K^+ na membrana plasmática e, assim, despolarizando-a. Em resposta a essa despolarização da membrana, os canais Ca^{2+} dependentes de voltagem abrem-se, permitindo o influxo de Ca^{2+} na célula. (O Ca^{2+} é também liberado do RE, em resposta à elevação inicial de $[Ca^{2+}]$ no citosol.) A $[Ca^{2+}]$ citosólica é agora alta o suficiente para provocar a liberação de insulina por exocitose. Os processos numerados são discutidos no texto.

FIGURA 23-29 Canais de K^+ dependente de ATP nas células β .

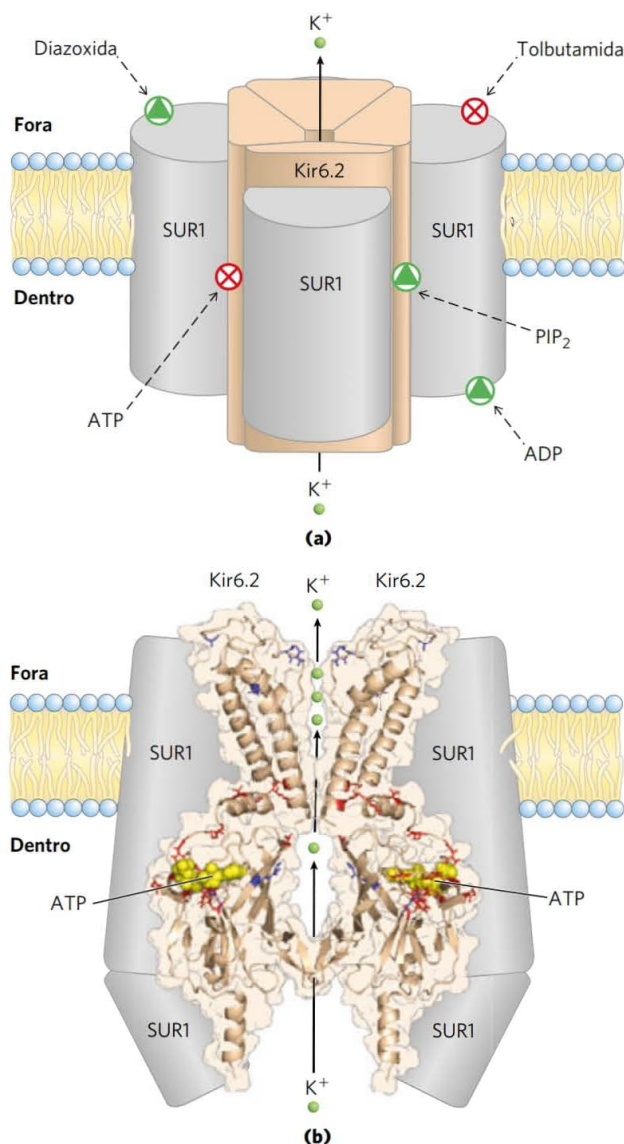
(a) O canal, visto no plano da membrana. O canal é formado por quatro subunidades Kir6.2 idênticas, rodeadas por quatro subunidades SUR1 (receptor de sulfonilureia). As subunidades SUR1 têm sítios de ligação ao ADP e ao fármaco diazoxida, o que favorece a abertura do canal, e à tolbutamida, um fármaco da sulfonilureia que favorece o fechamento do canal. As subunidades Kir6.2 constituem o canal e elas apresentam, no lado citosólico, sítios de ligação ao ATP e ao fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP_2), o qual favorece o fechamento e a abertura do canal, respectivamente. **(b)** Estrutura da porção Kir6.2 do canal, vista no plano da membrana. Para tornar mais claro, são mostrados somente dois domínios transmembrana e dois citosólicos. Três íons K^+ (em verde) são mostrados na região do filtro de seletividade. Mutações em determinados resíduos de aminoácidos (mostrados em vermelho) causam diabetes neonatal; mutações em outros (mostrados em azul) causam hiperinsulinismo infantil. Essa estrutura foi obtida pelo mapeamento da sequência conhecida de Kir6.2 em estruturas cristalinas de um canal Kir bacteriano (KirBac1.1) e nos domínios amina e carboxila de outra proteína Kir, Kir3.1. Compare essa estrutura com a do canal de K^+ na Figura 11-46. [Fonte: (b) KirBac1.1: PDB ID 1P7B, A. Kuo et al., *Science* 300:1922, 2003; Kir3.1: PDB ID 1U4E, S. Pegan et al., *Nature Neurosci.* 8:279, 2005. As coordenadas foram uma cortesia de Frances M. Ashcroft, Oxford University, usada, com permissão, de S. Haider e M. S. P. Sansom para recriar um modelo publicado em J. F. Antcliff et al., *EMBO J.* 24:229, 2005.]

glicose mais alta, 2 a [ATP] aumenta, causando o fechamento dos **canais de K^+ dependentes de ATP** na membrana plasmática. 3 O efluxo reduzido de K^+ despolariza a membrana. (Lembre-se, da Seção 12.7, de que a saída desse K^+ através de um canal de K^+ aberto hiperpolariza a membrana; portanto, fechar o canal de K^+ despolariza efetivamente a membrana.) A despolarização abre canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, e 4 o aumento resultante na $[Ca^{2+}]$ citosólica desencadeia 5 a liberação da insulina por exocitose. O cérebro integra o suprimento e a demanda de energia, e os sinais dos sistemas nervosos parassimpático e simpático também afetam (estimulam e inibem, respectivamente) a liberação da insulina. Um circuito simples de retroalimentação limita a liberação do hormônio: a insulina reduz a glicose sanguínea, estimulando sua captação pelos tecidos; a redução na glicose sanguínea é detectada pelas células β pelo fluxo diminuído na reação da hexocinase; isso reduz ou interrompe a liberação da insulina. Essa regulação por retroalimentação mantém a concentração da glicose sanguínea praticamente constante apesar da grande variação na captação dietética.

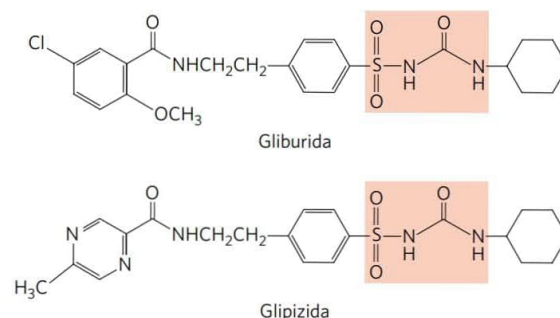


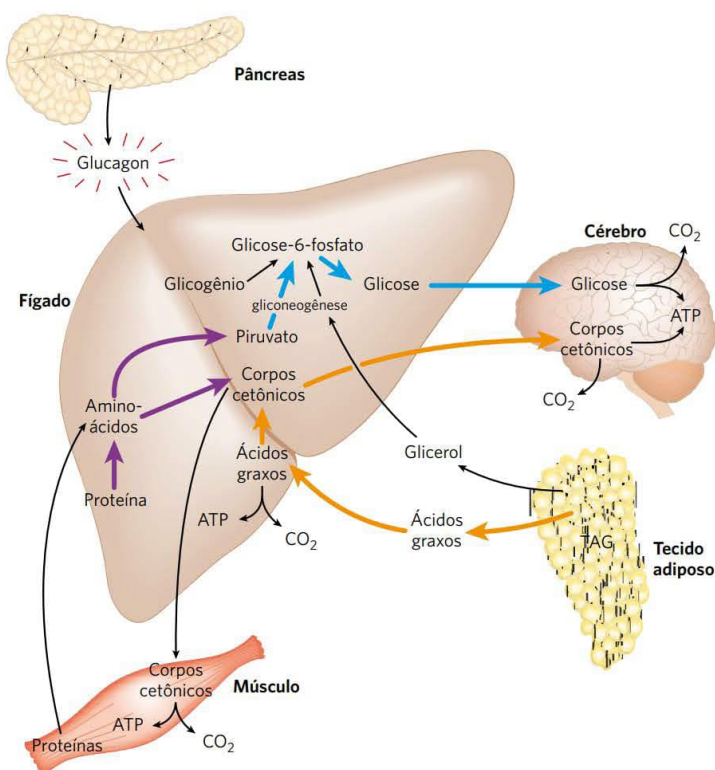
A atividade de canais de K^+ dependentes de ATP é fundamental para a regulação da secreção de insulina pelas células β . Os canais são octâmeros, formados por quatro subunidades Kir6.2 idênticas e quatro subunidades SUR1 idênticas, e são construídos nos mesmos moldes dos canais de K^+ das bactérias e das outras células eucarióticas (ver Figuras 11-45 e 11-46). As quatro subunidades Kir6.2 formam um cone ao redor do canal de K^+ e funcionam como mecanismo de filtro de seletividade controlado por ATP (**Figura 23-29**). Quando a [ATP] aumenta (indicando aumento da glicose no sangue), os canais de K^+ fecham-se, despolarizando a membrana plasmática e desencadeando a liberação de insulina, como mostrado na Figura 23-28.

As **sulfonilureias**, medicação oral utilizada no tratamento do diabetes melito tipo 2, ligam-se às subunidades SUR1 (receptor de sulfonilureia) dos canais de K^+ , fechan-



do-os e estimulando a liberação de insulina. A primeira geração desses fármacos, incluindo a tolbutamida, foi desenvolvida na década de 1950. A segunda geração, incluindo gliburida (Micronase), glipizida (Glucotrol) e glimepirida (Amaryl), é mais potente e tem menos efeitos colaterais. (A porção sulfonilureia está destacada em vermelho-claro nas estruturas seguintes.)



**FIGURA 23-30 O estado de jejum: o fígado glicogênico.**

Após algumas horas sem alimento, o fígado torna-se a principal fonte de glicose para o cérebro. O glicogênio hepático é degradado e a glicose-1-fosfato produzida é convertida em glicose-6-fosfato e, em seguida, em glicose livre, que é liberada na corrente sanguínea. Os aminoácidos procedentes da degradação das proteínas no fígado e no músculo e o glicerol oriundo da degradação dos TAG no tecido adiposo são utilizados para a gliconeogênese. O fígado usa os ácidos graxos como seu combustível principal, e o excesso de acetil-CoA é convertido em corpos cetônicos exportados para outros tecidos; o cérebro é particularmente dependente desse combustível quando há deficiência de fornecimento de glicose (ver Figura 23-23). As setas azuis mostram a trajetória da glicose; as setas alaranjadas, a dos lipídeos; e as setas roxas, a dos aminoácidos.

As sulfonilureias são usadas, às vezes, em combinação com injeção de insulina, mas frequentemente conseguem controlar sozinhas o diabetes tipo 2.

Mutações no canal de K^+ dependente de ATP das células β são, felizmente, raras. Mutações em Kir6.2 que causam a *abertura* permanente dos canais (resíduos em vermelho na Figura 23-29b) originam diabetes melito neonatal, com hiperglicemia grave, que requer insulino-terapia. Outras mutações em Kir6.2 ou em SUR1 (resíduos em azul na Figura 23-29b) resultam em canais de K^+ permanentemente *fechados* e liberação contínua de insulina. Pessoas com essas mutações, se não forem tratadas, desenvolvem hiperinsulinemia congênita (hiperinsulinismo da infância); o excesso de

insulina causa hipoglicemia grave (baixa glicose sanguínea), levando a danos cerebrais irreversíveis. Um tratamento eficaz é a remoção cirúrgica de parte do pâncreas para reduzir a produção do hormônio. ■

O glucagon opõe-se a níveis baixos de glicose sanguínea

Várias horas após a ingestão de carboidratos, os níveis de glicose sanguínea diminuem levemente devido à oxidação da glicose pelo cérebro e por outros tecidos. A diminuição da glicose sanguínea desencadeia a secreção do **glucagon** e reduz a liberação da insulina (**Figura 23-30**).

O glucagon causa um *aumento* na concentração sanguínea da glicose de várias maneiras (Tabela 23-5). Como

TABELA 23-5 Efeitos do glucagon sobre a glicose sanguínea: produção e liberação de glicose pelo fígado

Efeito metabólico	Efeito sobre o metabolismo da glicose	Enzima-alvo
↑ Degradação de glicogênio (fígado)	Glicogênio \longrightarrow glicose	↑ Glicogênio-fosforilase
↓ Síntese de glicogênio (fígado)	Menos glicose armazenada como glicogênio	↓ Glicogênio-sintase
↓ Glicólise (fígado)	Menos glicose usada como combustível no fígado	↓ PFK-1
↑ Gliconeogênese (fígado)	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;"> Aminoácidos Glicerol Oxalacetato </div> <div style="font-size: 2em; margin-right: 10px;">}</div> <div>\longrightarrow glicose</div> </div>	↑ FBPase-2 ↓ Piruvato-cinase ↑ PEP-carboxicinas
↑ Mobilização de ácidos graxos (tecido adiposo)	Menos glicose usada como combustível pelo fígado e pelo músculo	↑ Lipase sensível a hormônio
		↑ PKA (perilipina-P)
↑ Cetogênese	Fornece alternativa à glicose como fonte de energia para o cérebro	↓ Acetil-CoA-carboxilase

a adrenalina, ele estimula a degradação do glicogênio hepático por ativar a glicogênio-fosforilase e inativar a glicogênio-sintase; ambos os efeitos são o resultado da fosforilação de enzimas reguladas, desencadeada pelo cAMP. O glucagon inibe, no fígado, a degradação da glicose pela glicólise e estimula sua síntese pela gliconeogênese. Ambos os efeitos resultam da redução da concentração da frutose-2,6-bisfosfato, inibidor alostérico da enzima gliconeogênica frutose-1,6-bisfosfatase (FBPase-1) e ativador da enzima glicolítica fosfofrutocinase 1. Lembre-se de que a [frutose-2,6-bisfosfato] é controlada, em última análise, por uma reação de fosforilação dependente de cAMP (ver Figura 15-19). O glucagon também inibe a enzima glicolítica piruvato-cinase (promovendo sua fosforilação dependente de cAMP), bloqueando a conversão do fosfoenolpiruvato em piruvato e impedindo a oxidação do piruvato no ciclo do ácido cítrico. O consequente acúmulo de fosfoenolpiruvato favorece a gliconeogênese. Esse efeito é aumentado pela estimulação pelo glucagon da síntese da enzima gliconeogênica PEP-carboxicinase. Pela estimulação da degradação do glicogênio, prevenção da glicólise e promoção da gliconeogênese nos hepatócitos, o glucagon permite que o fígado exporte glicose, restaurando seu nível sanguíneo normal.

Embora seu alvo principal seja o fígado, o glucagon (como a adrenalina) também afeta o tecido adiposo, ativando a degradação de TAG por causar fosforilação dependente de cAMP da perilipina e da lipase sensível a hormônio. As lipases ativadas liberam ácidos graxos livres, que são exportados como combustível para o fígado e outros tecidos, poupando glicose para o cérebro. O efeito final do glucagon é, portanto, estimular a síntese e a liberação da glicose pelo fígado e mobilizar os ácidos graxos do tecido adiposo para serem usados no lugar da glicose por outros tecidos que não o cérebro. Todos esses efeitos do glucagon são mediados por fosforilação proteica dependente de cAMP.

O metabolismo é alterado durante o jejum e a inanição para prover combustível para o cérebro

As reservas de combustível de um adulto humano saudável são de três tipos: glicogênio armazenado no fígado e, em menor quantidade, no músculo; grandes quantidades de triacilgliceróis no tecido adiposo; e proteínas teciduais que podem ser degradadas, quando necessário, para fornecer combustível (Tabela 23-6).

Duas horas após uma refeição, o nível de glicose sanguínea está levemente diminuído, e os tecidos recebem glicose liberada a partir do glicogênio hepático. Há pouca ou nenhuma síntese de triacilgliceróis. Quatro horas após a refeição, a glicose sanguínea está mais reduzida, a secreção de insulina diminuiu e a secreção de glucagon está aumentada. Esses sinais hormonais mobilizam os triacilgliceróis do tecido adiposo, que agora se tornam o principal combustível para o músculo e o fígado. A **Figura 23-31** mostra as respostas ao jejum prolongado. ❶ Para fornecer glicose para o cérebro, o fígado degrada determinadas proteínas – aquelas mais dispensáveis em um organismo que não está se alimentando. Seus aminoácidos não essenciais são transaminados ou desaminados (Capítulo 18), e ❷ os grupos amina extras são convertidos em ureia, que é exportada pela corrente sanguínea para os rins e excretada na urina.

Também no fígado, e, de certa forma, nos rins, os esqueletos carbonados dos aminoácidos glicogênicos são convertidos em piruvato ou intermediários do ciclo do ácido cítrico. ❸ Esses intermediários (assim como o glicerol dos TAG do tecido adiposo) fornecem os materiais de partida para a gliconeogênese no fígado, ❹ gerando glicose para exportar para o cérebro. ❺ Os ácidos graxos liberados do tecido adiposo são oxidados a acetil-CoA no fígado, mas, como o oxalacetato está esgotado pelo uso de intermediá-

TABELA 23-6 Combustível metabólico disponível em um homem com peso normal de 70 kg e em um homem obeso com 140 kg no início do jejum

Tipo de combustível	Peso (kg)	Equivalente calórico (milhares de kcal [kJ])	Sobrevivência estimada (meses) ^a
Homem com peso normal, 70 kg			
Triacilgliceróis (tecido adiposo)	15	140 (590)	
Proteínas (principalmente músculo)	6	24 (100)	
Glicogênio (músculo, fígado)	0,23	0,90 (3,8)	
Combustíveis circulantes (glicose, ácidos graxos, triacilgliceróis, etc.)	0,023	0,10 (0,42)	
Total		165 (690)	3
Homem obeso, 140 kg			
Triacilgliceróis (tecido adiposo)	80	750 (3.100)	
Proteínas (principalmente músculo)	8	32 (130)	
Glicogênio (músculo, fígado)	0,23	0,92 (3,8)	
Combustíveis circulantes	0,025	0,11 (0,46)	
Total		783 (3.200)	14

^aO tempo de sobrevivência é calculado assumindo um gasto de energia basal de 1.800 kcal/dia.

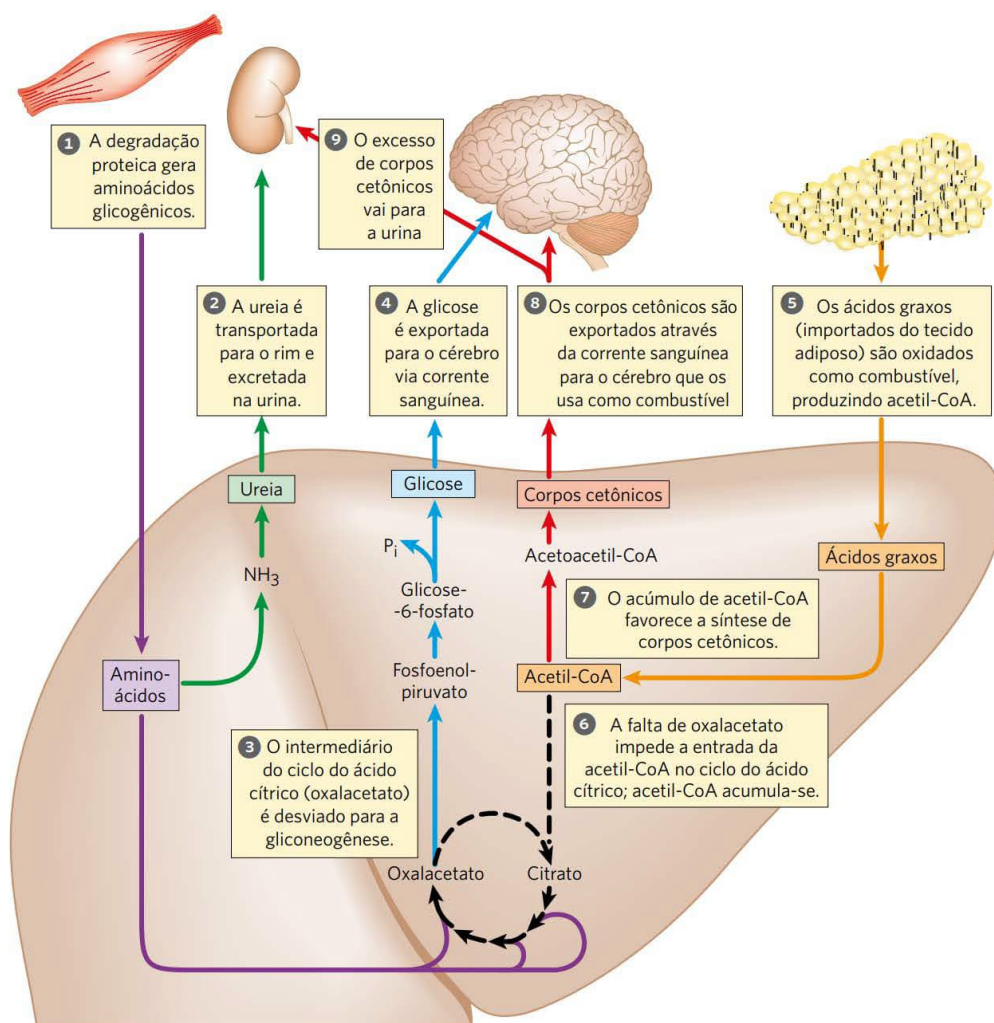
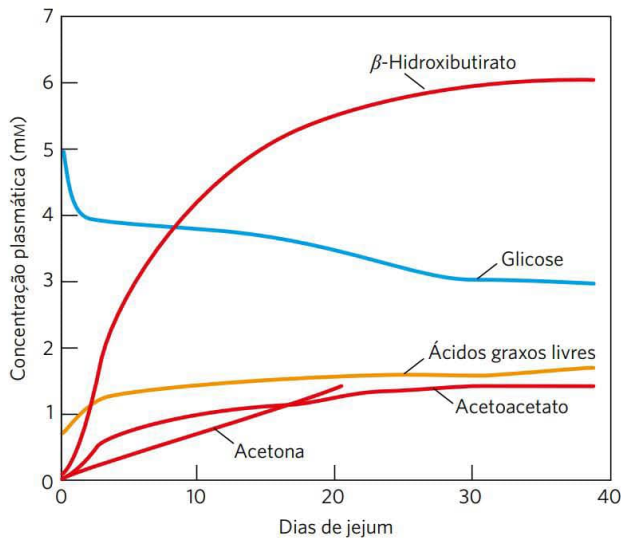


FIGURA 23-31 Metabolismo energético no fígado durante jejum prolongado ou no diabetes melito não controlado. As etapas numeradas estão descritas no texto. Após o esgotamento dos carboidratos armazenados (glicogênio), a gliconeogênese no fígado torna-se a principal fonte de glicose para o cérebro (setas azuis). A NH_3 da desaminação de aminoácidos é convertida em ureia e excretada (setas verdes). Os aminoácidos glicogênicos, provenientes da degradação das proteínas (setas roxas), fornecem substratos para a gliconeogênese, e a glicose é exportada para o cérebro. Os ácidos graxos do tecido adiposo são importados para o fígado e são oxidados a acetil-CoA (setas cor de laranja), e o acetil-CoA é o substrato para a formação dos corpos cetônicos no fígado, os quais são exportados para o cérebro para servirem como a fonte principal de energia (setas vermelhas). Quando a concentração dos corpos cetônicos no sangue excede a capacidade do rim de reabsorver as cetonas, estes compostos começam a aparecer na urina.

rios do ciclo do ácido cítrico na gliconeogênese, **6** a entrada da acetil-CoA no ciclo é inibida e ela se acumula. **7** Isso favorece a formação de acetoacetil-CoA e corpos cetônicos. Após alguns dias de jejum, os níveis de corpos cetônicos no sangue aumentam (**Figura 23-32**), à medida que são exportados do fígado para o coração, músculo esquelético e cérebro, os quais utilizam esses combustíveis em vez da glicose (**Figura 23-31, 8**).

A acetil-CoA é fundamental na regulação do destino do piruvato; ela inibe alostericamente a piruvato-desidrogenase e estimula a piruvato-carboxilase. Dessa forma, a acetil-CoA previne sua própria produção a partir do piruvato, enquanto estimula a conversão do piruvato em oxalacetato, a primeira etapa da gliconeogênese.

Os triacilgliceróis armazenados no tecido adiposo de um adulto com peso normal podem fornecer combustível suficiente para manter uma taxa metabólica basal por cerca de três meses; um adulto muito obeso tem combustível armazenado suficiente para suportar um jejum de mais de um ano (**Tabela 23-6**). Quando acabam as reservas de gordura, começa a degradação de proteínas *essenciais*; isso leva à perda das funções cardíaca e hepática, e, na inanição prolongada, à morte. A gordura armazenada fornece energia suficiente (calorias) durante o jejum ou em uma dieta rígida, mas as vitaminas e os minerais devem ser fornecidos, sendo necessários aminoácidos glicogênicos na dieta em quantidade suficiente para substituir aqueles utilizados na gliconeogênese. As formulações em uma dieta de emagre-



cimento geralmente são enriquecidas com vitaminas, minerais e aminoácidos ou proteínas.

A adrenalina sinaliza atividade iminente

Quando um animal é confrontado com uma situação estressante que requer atividade aumentada – lutar ou fugir, em casos extremos – os sinais neuronais originários do cérebro provocam a liberação de adrenalina e de noradrenalina da medula da glândula suprarrenal. Ambos os hormônios dilatam as vias aéreas para facilitar a captação de O_2 , aumentam a frequência e a força dos batimentos cardíacos e elevam a pressão arterial, favorecendo o fluxo de O_2 e de combustíveis para os tecidos (Tabela 23-7). Essa é a resposta de “luta ou fuga”.

A adrenalina age principalmente nos tecidos muscular, adiposo e hepático. Ela ativa a glicogênio-fosforilase e inativa a glicogênio-sintase pela fosforilação dependente de cAMP dessas enzimas, estimulando a conversão do glicogênio *hepático* em glicose sanguínea, o combustível para o trabalho muscular anaeróbico. A adrenalina promove a de-

FIGURA 23-32 Concentração plasmática de ácidos graxos, glicose e corpos cetônicos durante seis semanas de jejum. Apesar dos mecanismos hormonais para manter o nível de glicose no sangue, a glicose começa a diminuir dentro de 2 dias após o início de um jejum (em azul). O nível de corpos cetônicos, quase indetectáveis antes do jejum, aumenta drasticamente após 2 a 4 dias de jejum (em vermelho). Estas cetonas hidrossolúveis, acetoacetato e β -hidroxibutirato, suplementam a glicose como fonte de energia para o cérebro durante o jejum prolongado. A acetona, um corpo cetônico minoritário, não é metabolizada e é eliminada com a respiração. Um aumento muito menor de ácidos graxos também ocorre no sangue (em cor de laranja), mas esse aumento não contribui para o metabolismo energético no cérebro porque os ácidos graxos não atravessam a barreira hematoencefálica. [Dados de G. F. Cahill, Jr., *Annu. Rev. Nutr.* 26:1, 2006, Fig. 2.]

gradação anaeróbica do glicogênio *muscular* pela fermentação em ácido láctico, estimulando a formação glicolítica de ATP. A estimulação da glicólise é acompanhada pela elevação da concentração de frutose-2,6-bisfosfato, um ativador alostérico potente da fosfofrutocinase 1, enzima-chave da glicólise. A adrenalina também estimula a mobilização de gordura no tecido adiposo, ativando a lipase sensível a hormônios e afastando a perilipina (Figura 17-3). Por fim, a adrenalina estimula a secreção de glucagon e inibe a secreção de insulina, reforçando seu efeito de mobilização de combustíveis e inibição de seu armazenamento.

O cortisol sinaliza estresse, incluindo baixa glicose sanguínea

Uma grande variedade de agentes que causam estresse (ansiedade, medo, dor, hemorragia, infecção, glicose sanguínea baixa, jejum) estimula a liberação do hormônio corticosteroide **cortisol** do córtex da glândula suprarrenal. O cortisol age no músculo, no fígado e no tecido adiposo para suprir o organismo com combustível para resistir à situação estressante. O cortisol é um hormônio de ação relativamente lenta, que altera o metabolismo pela mudança nos tipos e nas quantidades de determinadas enzimas sintetizadas em suas células-alvo, em vez da regulação da atividade de moléculas enzimáticas já existentes.

TABELA 23-7 Efeitos fisiológicos e metabólicos da adrenalina: preparação para ação

Efeitos imediatos	Efeito total
Fisiológicos ↑ Frequência cardíaca ↑ Pressão sanguínea ↑ Dilatação das vias aéreas	Aumento da liberação de O_2 para os tecidos (músculo)
Metabólicos ↑ Degradação de glicogênio (músculo, fígado) ↓ Síntese de glicogênio (músculo, fígado) ↑ Gliconeogênese (fígado)	
↑ Glicólise (músculo)	
↑ Mobilização de ácidos graxos (tecido adiposo)	Aumento da produção de glicose para combustível
↑ Secreção de glucagon	Aumento da produção de ATP no músculo
↓ Secreção de insulina	Aumento da disponibilidade de ácidos graxos como combustível
	Reforço dos efeitos metabólicos da adrenalina

No tecido adiposo, o cortisol leva a uma liberação aumentada de ácidos graxos dos TAG armazenados. Os ácidos graxos exportados servem como combustível para outros tecidos e o glicerol é usado na gliconeogênese no fígado. O cortisol estimula a degradação das proteínas musculares não essenciais e a exportação dos aminoácidos para o fígado, onde servem como precursores para a gliconeogênese. No fígado, o cortisol promove a gliconeogênese, estimulando a síntese da PEP-carboxicinase; o glucagon tem o mesmo efeito, ao passo que a insulina tem o efeito oposto. A glicose assim produzida é armazenada no fígado como glicogênio ou exportada imediatamente para os tecidos que precisam dela como combustível. O efeito líquido dessas alterações metabólicas é a restauração dos níveis normais de glicose sanguínea e o aumento dos estoques de glicogênio, pronto para dar suporte à resposta de luta ou fuga comumente associada ao estresse. Os efeitos do cortisol, portanto, contrabalançam os da insulina. Durante períodos prolongados de estresse, a liberação constante de cortisol perde seu valor adaptativo positivo e começa a causar danos ao músculo e ao osso, prejudicando as funções endócrina e imune.



A doença de Cushing é uma condição médica na qual o cortisol é superproduzido por um tumor hipofisário. Ela é tratada por cirurgia para remover o tumor, seguido de quimioterapia para matar as células tumorais remanescentes. A doença de Addison resulta da subprodução de cortisol e é tratada pela administração de hidrocortisona (o nome farmacêutico do cortisol). ■

O diabetes melito resulta de defeitos na produção ou na ação da insulina



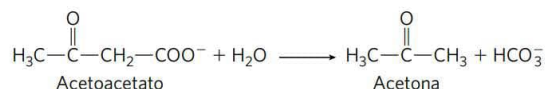
Diabetes melito é uma doença relativamente comum: cerca de 9% da população geral dos Estados Unidos e quase 25% da população com mais de 65 anos apresentam algum grau de anormalidade no metabolismo da glicose que é indicativo de diabetes ou uma tendência para a condição. Existem duas classes clínicas principais da doença: **diabetes tipo 1**, às vezes denominado diabetes melito insulina-dependente (DMID), e **diabetes tipo 2**, ou diabetes melito não insulina-dependente (DMNID), também chamado de diabetes resistente à insulina.

O diabetes tipo 1 começa cedo na vida e os sintomas rapidamente se tornam graves. Essa doença responde à injeção de insulina, visto que o defeito metabólico se origina da destruição autoimune das células β -pancreáticas e de uma consequente incapacidade de produzir insulina em quantidade suficiente. O diabetes tipo 1 requer insulino-terapia e controle cuidadoso, por toda a vida, do equilíbrio entre a ingestão dietética e a dose de insulina. Os sintomas característicos do diabetes tipo 1 (e tipo 2) são sede excessiva e micção frequente (poliúria), levando à ingestão de grandes volumes de água (polidipsia). (“Diabetes melito” significa “excreção excessiva de urina doce”.) Esses sintomas são devidos à excreção de grande quantidade de glicose na urina, condição conhecida como **glicosúria**.

O diabetes tipo 2 desenvolve-se lentamente (em geral em pessoas mais velhas e obesas) e os sintomas são mais brandos e, com frequência, não reconhecidos no início. Este é, na verdade, um grupo de doenças nas quais a atividade reguladora da insulina está perturbada: a insulina é produ-

zida, porém alguns aspectos do sistema de resposta ao hormônio estão defeituosos. As pessoas com essa enfermidade são resistentes à insulina. A conexão entre o diabetes tipo 2 e a obesidade (discutida adiante) é uma área de pesquisa ativa e promissora.

As pessoas com um ou outro tipo de diabetes não conseguem captar de maneira eficiente a glicose sanguínea; lembre-se de que a insulina provoca o deslocamento dos transportadores de glicose GLUT4 para a membrana plasmática no músculo e no tecido adiposo (ver Figura 12-20). Sem glicose disponível, os ácidos graxos tornam-se o combustível principal, o que leva a outra alteração metabólica característica no diabetes: a oxidação excessiva, mas incompleta, dos ácidos graxos no fígado. A acetil-CoA produzida pela β -oxidação não pode ser completamente oxidada pelo ciclo do ácido cítrico, pois a alta relação $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+]$ produzida pela β -oxidação inibe o ciclo (lembre-se de que três etapas do ciclo convertem NAD^+ em NADH). O acúmulo de acetil-CoA leva à superprodução de corpos cetônicos, acetoacetato e β -hidroxibutirato, que não podem ser usados pelos tecidos extra-hepáticos na velocidade com que são produzidos no fígado. Além do β -hidroxibutirato e do acetoacetato, o sangue de pessoas diabéticas também contém quantidades pequenas de acetona, que resulta da descarboxilação espontânea do acetoacetato:



A acetona é volátil e é exalada, de modo que, no diabetes não controlado, o hálito tem odor característico, às vezes confundido com etanol. Um indivíduo com diabetes que está passando por confusão mental devida à glicose alta é ocasionalmente diagnosticado como intoxicado, um erro que pode ser fatal. A superprodução de corpos cetônicos, chamada de **cetose**, resulta em uma concentração muito aumentada desses compostos no sangue (cetonemia) e na urina (cetonúria).

Os corpos cetônicos são ácidos carboxílicos que se ionizam, liberando prótons. No diabetes não controlado, esta produção de ácido pode superar a capacidade do sistema de tamponamento sanguíneo do bicarbonato e produzir uma redução no pH sanguíneo, chamada de **acidose**, ou, em combinação com a cetose, **cetoacidose**, combinação potencialmente letal.

As medidas bioquímicas de amostras de sangue ou de urina são essenciais no diagnóstico e no tratamento do diabetes. O **teste de tolerância à glicose** constitui um critério diagnóstico sensível. A pessoa faz jejum por 12 horas, depois bebe uma dose-teste de 100 g de glicose dissolvida em um copo de água. A concentração sanguínea da glicose é medida antes do teste e por várias horas em intervalos de 30 minutos. Uma pessoa saudável assimila a glicose rapidamente, e o aumento no sangue não é maior do que 9 a 10 mM; pouca ou nenhuma glicose aparece na urina. No diabetes, a pessoa assimila muito pouco da dose-teste de glicose; o nível do açúcar no sangue aumenta drasticamente e retorna muito lentamente ao nível do jejum. Uma vez que os níveis sanguíneos de glicose excedem o limiar do rim (cerca de 10 mM), ela aparece também na urina. ■

RESUMO 23.3 Regulação hormonal do metabolismo energético

- A concentração da glicose no sangue é regulada hormonalmente. As flutuações na glicose sanguínea (normalmente de 70 a 100 mg/100 mL, ou cerca de 4,5 mM) devidas à ingestão dietética ou ao exercício extenuante são contrabalançadas por uma grande variedade de alterações no metabolismo de vários órgãos, provocadas hormonalmente.
- Alta glicose sanguínea provoca a liberação de insulina, que aumenta a captação de glicose pelos tecidos e favorece o armazenamento de combustíveis sob a forma de glicogênio e triacilgliceróis, enquanto inibe a mobilização dos ácidos graxos no tecido adiposo.
- Baixa glicose sanguínea provoca a liberação do glucagon, que estimula a liberação da glicose a partir do glicogênio hepático e modifica o metabolismo energético no fígado e no músculo no sentido de oxidar ácidos graxos, poupando glicose para ser usada pelo cérebro. No jejum prolongado, os triacilgliceróis tornam-se o combustível principal; o fígado converte ácidos graxos em corpos cetônicos para exportar para outros tecidos, incluindo o cérebro.
- A adrenalina prepara o organismo para aumentar a atividade, mobilizando glicose a partir de glicogênio e outros precursores e liberando a glicose no sangue.
- O cortisol, liberado em resposta a uma grande variedade de fatores estressantes (incluindo baixa glicose sanguínea), estimula a gliconeogênese a partir de aminoácidos e glicerol no fígado, aumentando a glicose sanguínea e contrabalançando os efeitos da insulina.
- No diabetes, a insulina não é produzida ou não é reconhecida pelos tecidos, e a captação da glicose a partir do sangue é comprometida. Quando os níveis de glicose sanguínea são altos, ela é excretada. Os tecidos dependem, então, de ácidos graxos como combustível (com produção de corpos cetônicos) e degradam proteínas celulares para fornecer aminoácidos glicogênicos para a síntese de glicose. O diabetes não controlado se caracteriza por altos níveis de glicose no sangue e na urina e produção e excreção de corpos cetônicos.

23.4 Obesidade e regulação da massa corporal



Na população dos Estados Unidos, 35% dos adultos são obesos e outros 35% têm sobrepeso, conforme definido em termos de **índice de massa corporal (IMC)**, calculado como $(\text{massa em kg})/(\text{altura em m})^2$. Um IMC abaixo de 25 é considerado normal; uma pessoa com IMC de 25 a 30 tem sobrepeso; IMC maior que 30 indica **obesidade**. A obesidade é uma ameaça à vida, aumenta significativamente a chance do desenvolvimento de diabetes tipo 2, assim como infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e cânceres de colo, mama, próstata e endométrio. Como consequência, existe grande interesse em entender como a massa corporal e o armazenamento de gordura no tecido adiposo são regulados. ■

Em uma primeira abordagem, a obesidade é o resultado da ingestão de mais calorias na dieta do que as gastas pelas atividades corporais que consomem combustível. O corpo lida de três formas com o excesso de calorias dietéticas: (1) converte o excesso de combustível em gordura e a armazena no tecido adiposo, (2) queima o excesso de combustível em exercício extra e (3) “desperdiça” combustível, desviando-o para a produção de calor (termogênese) pelas mitocôndrias desacopladas. Nos mamíferos, um conjunto complexo de sinais hormonais e neuronais age para manter o equilíbrio entre a captação de combustível e o gasto de energia, de modo a manter a quantidade de tecido adiposo em nível adequado. Lidar de forma eficaz com a obesidade requer a compreensão da forma de funcionamento das várias verificações e balanços em condições normais e como esses mecanismos homeostáticos podem falhar.

O tecido adiposo tem funções endócrinas importantes

Uma hipótese inicial para explicar a homeostasia da massa corporal, o modelo da “retroalimentação negativa da adiposidade”, postulava um mecanismo que inibe o comportamento alimentar e aumenta o gasto de energia quando o peso corporal excede um determinado valor (o ponto de ajuste); a inibição é liberada quando o peso corporal cai abaixo do ponto de ajuste (**Figura 23-33**). Esse modelo prevê que um sinal de retroalimentação que se origina no tecido adiposo influencia os centros encefálicos que controlam o comportamento alimentar e a atividade metabólica e motora. O primeiro fator a ser descoberto, em 1994, foi a leptina, e pesquisas posteriores revelaram que o tecido adiposo é um importante órgão endócrino que produz hormônios peptídicos, conhecidos como **adipocinas**. Elas podem agir localmente (ação autócrina e parácrina) ou sistemicamente (ação endócrina), levando informações para outros tecidos e para o cérebro sobre a adequação das reservas de energia (TAG) armazenadas no tecido adiposo. As adipocinas normalmente produzem mudanças no metabolismo energético e no comportamento alimentar, as quais res-

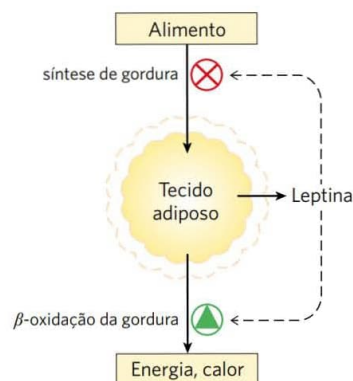


FIGURA 23-33 Modelo do ponto de ajuste para a manutenção da massa constante. Quando a massa do tecido adiposo aumenta (linha tracejada), a leptina liberada inibe o consumo de alimentos e a síntese de gordura, estimulando a oxidação dos ácidos graxos. Quando a massa do tecido adiposo diminui (linha contínua), a produção reduzida da leptina favorece uma maior ingestão de alimento e uma redução na oxidação dos ácidos graxos.



FIGURA 23-34 Obesidade causada pela produção deficiente de leptina. Ambos os camundongos, que têm a mesma idade, têm defeitos no gene *OB*. O camundongo da direita foi injetado diariamente com leptina purificada e pesa 35 g. O camundongo da esquerda não recebeu leptina, e, conseqüentemente, come mais e é menos ativo; ele pesa 67 g. [The Rockefeller University/AP Photo.]

tauram as reservas adequadas de combustível e mantêm a massa corporal. Quando as adipocinas são sub ou superproduzidas, o descontrole resultante pode levar a uma doença muito grave.

A **leptina** (do grego, *leptos*, “magro”) é uma adipocina (167 aminoácidos) que, ao alcançar o cérebro, age nos receptores hipotalâmicos e reduz o apetite. A leptina foi identificada pela primeira vez, em camundongos de laboratório, como o produto de um gene designado *OB* (obeso). Camundongos com duas cópias defeituosas desse gene (genótipo *ob/ob*; letras minúsculas significam uma forma mutante do gene) mostram o comportamento e a fisiologia dos animais em constante estado de inanição: seus níveis plasmáticos de cortisol estão elevados; eles exibem apetite irrestrito, são incapazes de ficar aquecidos, crescem anormalmente grandes e não se reproduzem. Em consequência do apetite incontido, eles tornam-se muito obesos, pesando até três vezes mais do que os camundongos normais (**Figura 23-34**). Também apresentam distúrbios metabólicos muito semelhantes aos vistos no diabetes e são resistentes à insulina. Quando se injeta leptina nestes camundongos *ob/ob*, eles comem menos, perdem peso e aumentam sua atividade locomotora e a termogênese.

Um segundo gene de camundongos, designado *DB* (diabético), também tem um papel na regulação do apetite. Camundongos com duas cópias defeituosas (*db/db*) são obesos e diabéticos. O gene *DB* codifica o **receptor de leptina**. A função sinalizadora da leptina é perdida quando o receptor é defeituoso.

O receptor de leptina é expresso principalmente em regiões do cérebro que regulam o comportamento ali-

mentar – neurônios do **núcleo arqueado** do hipotálamo (**Figura 23-35a**). A leptina carrega a mensagem de que as reservas de gordura são suficientes, promove a redução do consumo de combustível e aumenta o gasto de energia. A interação leptina-receptor no hipotálamo altera a liberação de sinais neuronais para a região do cérebro que controla o apetite. A leptina também estimula o sistema nervoso simpático, aumentando a pressão sanguínea, a frequência cardíaca e a termogênese, pelo desacoplamento das mitocôndrias dos adipócitos marrons (**Figura 23-35b**). Lembre-se de que a proteína desacopladora UCP1 forma um canal na membrana mitocondrial interna que permite que os prótons entrem novamente na matriz mitocondrial sem passar pelo complexo da ATP-sintase. Isso permite a oxidação contínua de combustível (ácidos graxos nos adipócitos marrons) sem síntese de ATP, dissipando a energia na forma de calor e consumindo as calorias da dieta ou as gorduras armazenadas em grandes quantidades.

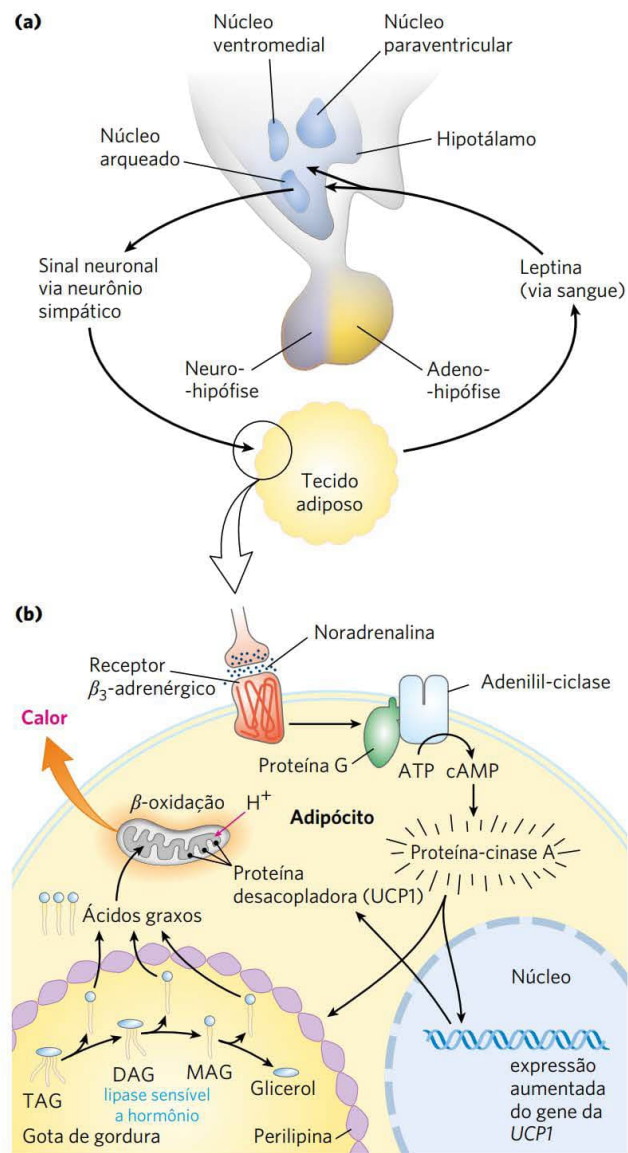
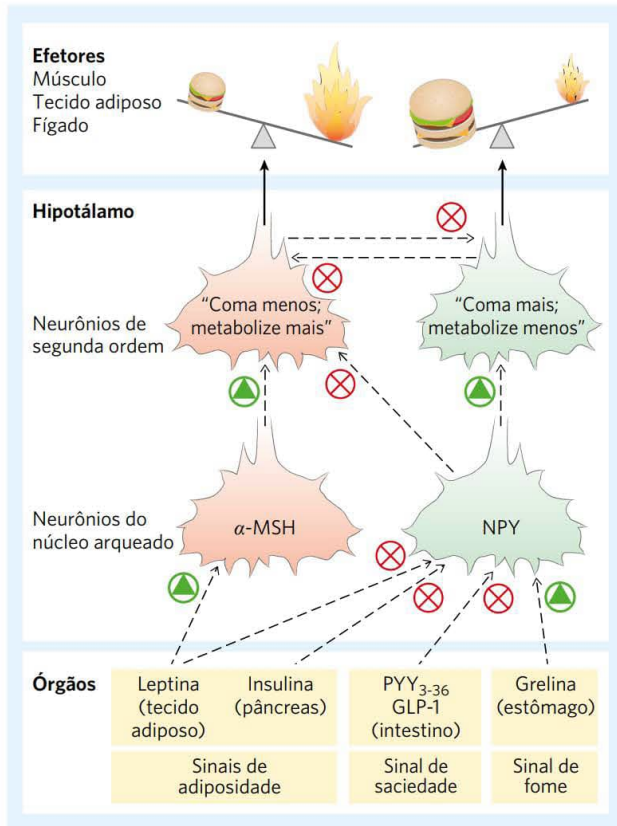


FIGURA 23-35 Regulação hipotalâmica da ingestão de alimento e do gasto de energia. (a) Papel do hipotálamo na sua interação com o tecido adiposo. O hipotálamo recebe informação (leptina) do tecido adiposo e responde com sinais neuronais para os adipócitos. (b) Esse sinal (noradrenalina) ativa a proteína-quinase A, que desencadeia a mobilização de ácidos graxos do TAG e sua oxidação desacoplada nas mitocôndrias, gerando calor, mas não ATP. DAG, diacilglicerol; MAG, monoacilglicerol.

**FIGURA 23-36 Hormônios que controlam a ingestão de alimento.**

No núcleo arqueado, dois grupos de células neurosecretoras recebem um sinal hormonal e liberam sinais neuronais para as células do músculo, do tecido adiposo e do fígado. A leptina e a insulina são liberadas do tecido adiposo e do pâncreas, respectivamente, em proporção com a massa da gordura corporal. Os dois hormônios agem sobre as células neurosecretoras anorexigênicas e provocam a liberação de α -MSH (hormônio estimulador de melanócitos); este hormônio envia o sinal a neurônios de segunda ordem no hipotálamo, os quais produzem sinais neuronais para comer menos e metabolizar mais combustível. A leptina e a insulina também agem sobre as células neurosecretoras orexigênicas e inibem a liberação de NPY, reduzindo o sinal de “comer mais” enviado para os tecidos. Como descrito mais adiante no texto, o hormônio gástrico grelina estimula o apetite, ativando as células que expressam o NPY; o PYY₃₋₃₆, liberado do cólon, inibe esses neurônios e diminui o apetite. Cada um dos tipos de células neurosecretoras inibe a produção de hormônios pelo outro tipo, de forma que qualquer estímulo que ative as células orexigênicas inativa as células anorexigênicas, e vice-versa. Isso fortalece o efeito dos sinais de estimulação.

com a utilização mais eficiente do combustível, resulta na recuperação das reservas no tecido adiposo, levando o sistema de volta ao equilíbrio.

A leptina também pode ser essencial ao desenvolvimento normal dos circuitos neuronais hipotalâmicos. Em camundongos, o crescimento das fibras nervosas a partir do núcleo arqueado durante o desenvolvimento cerebral inicial é diminuído na ausência de leptina, afetando os sinais orexigênicos e (em menor grau) os sinais anorexigênicos do hipotálamo. É possível que os níveis de leptina durante o desenvolvimento desses circuitos determinem os detalhes das conexões desse sistema de regulação.

A leptina estimula a produção de hormônios peptídicos anorexigênicos

Dois tipos de neurônios do núcleo arqueado controlam o influxo de combustível e seu metabolismo (**Figura 23-36**). Os neurônios **orexigênicos** (estimuladores de apetite) estimulam a ingestão de alimento pela produção e liberação do **neuropeptídeo Y (NPY)**, que faz o próximo neurônio do circuito enviar o sinal para o cérebro: coma! O nível sanguíneo do NPY aumenta durante o jejum, estando elevado em ambos os camundongos *ob/ob* e *db/db*. É provável que a alta concentração de NPY contribua para a obesidade nesses animais, que comem vorazmente.

Os neurônios **anorexigênicos** (inibidores de apetite) no núcleo arqueado produzem o **hormônio estimulante de α -melanócitos** (α -MSH, do inglês, *α -melanocyte-stimulating hormone*; também conhecido como melanocortina), formado a partir de seu precursor polipeptídico, a pró-opiomelanocortina (POMC; **Figura 23-5**). A liberação do α -MSH faz o neurônio seguinte no circuito enviar o sinal para o cérebro: pare de comer!

A quantidade de leptina liberada pelo tecido adiposo depende do número e do tamanho dos adipócitos. Quando a perda de peso reduz a massa de tecido lipídico, os níveis de leptina no sangue diminuem, a produção de NPY aumenta e o processo no tecido adiposo, mostrado na **Figura 23-35**, é revertido. O desacoplamento diminui, reduzindo a termogênese e poupando combustível, e a mobilização de gordura é reduzida em resposta à redução da sinalização pelo cAMP. O consumo de maior quantidade de alimento, combinado

A leptina dispara uma cascata de sinalização que regula a expressão gênica

O sinal da leptina é transduzido por um mecanismo usado também por receptores para interferon e fatores de crescimento, o sistema JAK-STAT (**Figura 23-37**). O receptor de leptina, que tem um único segmento transmembrana, forma um dímero quando a leptina se liga ao domínio extracelular de dois monômeros. Ambos os monômeros são fosforilados pela **Janus-cinase (JAK)**, em um resíduo de Tyr de seu domínio intracelular. Os resíduos de P-Tyr tornam-se locais de ancoragem para três proteínas que são transdutores de sinal e ativadores de transcrição (**STAT 3, 5 e 6**; às vezes chamadas de *fat-STAT*). As STAT ancoradas são, então, fosforiladas em resíduos de Tyr pela mesma JAK. Após a fosforilação, as STAT formam dímeros e são translocadas para o núcleo, onde se ligam a sequências específicas no DNA e estimulam a transcrição de genes-alvo, incluindo o gene da POMC, a partir do qual é produzido o α -MSH.

O aumento do catabolismo e da termogênese desencadeados pela leptina são devidos, em parte, ao aumento da síntese das mitocôndrias em adipócitos marrons e beges. A leptina estimula a síntese de UCP1, alterando as transmissões sinápticas de neurônios do núcleo arqueado para o tecido adiposo e outros tecidos por meio do sistema nervoso simpático. O consequente aumento da liberação de noradrenalina nesses tecidos atua através dos receptores β_3 -adrenérgicos para estimular a transcrição do gene da UCP1. O desacoplamento resultante da transferência de elétrons da fosforilação oxidativa consome gordura e é termogênico (**Figura 23-35**).

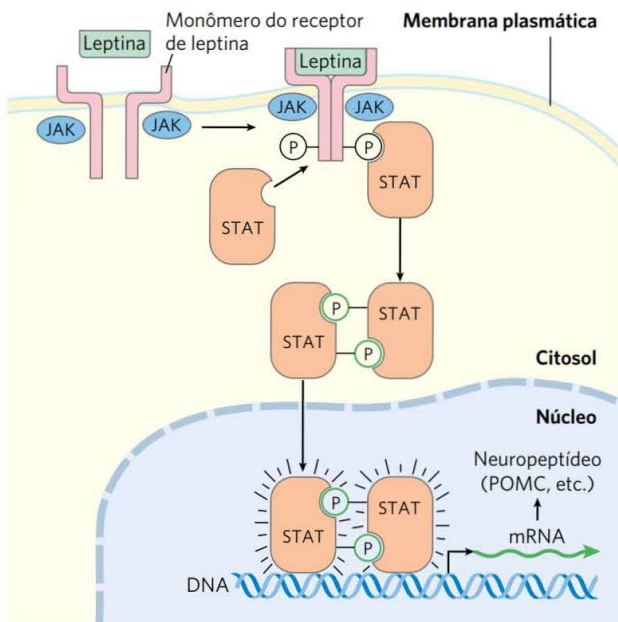


FIGURA 23-37 O mecanismo JAK-STAT da transdução de sinal da leptina no hipotálamo. A ligação da leptina induz a dimerização do seu receptor, seguida pela fosforilação de resíduos específicos de Tyr no domínio citosólico do receptor, catalisada pela Janus-cinase (JAK). As STAT ligadas ao receptor de leptina fosforilado são agora fosforiladas em resíduos de Tyr por uma atividade distinta da JAK. As STAT formam dímeros, ligando seus resíduos de P-Tyr fosforilados, e entram no núcleo. Lá, ligam-se a regiões reguladoras específicas no DNA e alteram a expressão de determinados genes. Os produtos desses genes influenciam o comportamento alimentar e o gasto de energia do organismo. [Fonte: informação de J. Auwerx e B. Staels, *Lancet* 351:737, 1998, Fig. 2.]

A obesidade humana seria o resultado de produção insuficiente de leptina, sendo, assim, tratável por injeções desse hormônio? Os níveis sanguíneos de leptina estão, na verdade, muito *mais altos* em animais obesos (incluindo os seres humanos) do que em animais com massa corporal normal (exceto, é claro, nos mutantes *ob/ob*, que não produzem leptina). Alguns elementos a jusante no sistema de resposta à leptina devem estar defeituosos nas pessoas obesas, e a elevação de leptina é o resultado de uma tentativa (malsucedida) de superar a resistência à leptina. Nos casos muito raros de seres humanos com obesidade extrema que têm um gene de leptina defeituoso (*OB*), as injeções de leptina resultam, de fato, em enorme perda de peso. Contudo, na imensa maioria das pessoas obesas, o gene *OB* está intacto. Em testes clínicos, a injeção de leptina não tem o efeito de redução de peso observado nos camundongos obesos *ob/ob*. A maioria dos casos de obesidade humana envolve, claramente, um ou mais fatores além da leptina.

O sistema da leptina pode ter evoluído para regular a resposta à fome

O sistema da leptina provavelmente evoluiu para ajustar a atividade e o metabolismo animal durante períodos de jejum e inanição, e não como um meio de restringir o ganho

de peso. A *redução* no nível de leptina, provocada pela deficiência nutricional, reverte os processos de termogênese ilustrados na Figura 23-35, permitindo a conservação de combustível. No hipotálamo, a redução do sinal da leptina também provoca redução na produção do hormônio da tireoide (reduzindo o metabolismo basal), redução na produção de hormônios sexuais (prevenindo a reprodução) e aumento na produção de glicocorticoides (mobilizando os recursos corporais geradores de combustível). Por minimização do gasto de energia e maximização do uso das reservas endógenas de energia, essas respostas mediadas pela leptina podem permitir a um animal sobreviver em períodos de grave privação nutricional. No fígado e no músculo, a leptina estimula **AMPK**, a **proteína-cinase ativada por AMP** (ver a seguir), e, por meio de sua ação, inibe a síntese de ácidos graxos e ativa a sua oxidação, favorecendo processos geradores de energia.

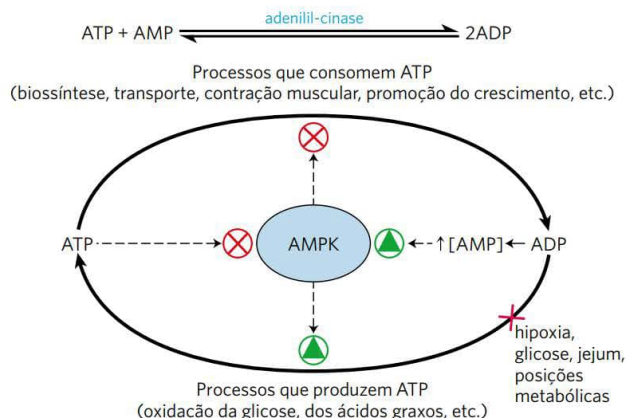
A insulina age no núcleo arqueado, regulando a ingestão de alimento e a conservação de energia

A secreção de insulina pode refletir o tamanho das reservas de gordura (adiposidade) e o equilíbrio do fluxo de energia (nível de glicose no sangue). Além de sua função endócrina em vários tecidos, a insulina age no sistema nervoso central (no hipotálamo) para inibir a ingestão de alimento (Figura 23-36). Os receptores de insulina dos neurônios orexigênicos no núcleo arqueado *inibem* a liberação de NPY, e os receptores de insulina dos neurônios anorexigênicos *estimulam* a produção de α -MSH, reduzindo, dessa forma, o influxo de combustível e aumentando a termogênese. A insulina também envia sinais ao músculo, ao fígado e ao tecido adiposo, pelos mecanismos descritos na Seção 23.3, para aumentarem a conversão de glicose em acetil-CoA, fornecendo o material de partida para a síntese de gordura.

A adiponectina age por meio da AMPK, aumentando a sensibilidade à insulina

A **adiponectina** é um hormônio peptídico produzido quase exclusivamente no tecido adiposo, uma adipocina que sensibiliza outros órgãos aos efeitos da insulina. A adiponectina circula no sangue e tem efeito potente sobre o metabolismo dos ácidos graxos e dos carboidratos no fígado e no músculo. Ela aumenta a captação de ácidos graxos pelos miócitos, a partir do sangue, e a taxa da β -oxidação no músculo. Além disso, bloqueia a síntese de ácidos graxos e a gliconeogênese nos hepatócitos e estimula a captação de glicose e seu catabolismo no fígado e no músculo.

Esses efeitos da adiponectina são indiretos e não totalmente compreendidos, mas a AMPK claramente controla muitos deles. Atuando por meio de seu GPCR, a adiponectina desencadeia a fosforilação e a ativação da AMPK. Lembre-se de que a AMPK é ativada por fatores que sinalizam a necessidade de mudar o metabolismo para a geração de energia e para longe da biossíntese que requer energia (Figura 23-38; ver também pp. 582-583). Quando ativada, a AMPK afeta profundamente o metabolismo de células individuais e, por meio de suas ações no cérebro, o metabolismo de todo o animal.



AMPK coordena o catabolismo e o anabolismo em resposta ao estresse metabólico

A AMPK emergiu como um ator central na coordenação de vias metabólicas, atividade do organismo e comportamento alimentar (Figura 23-39). Esta proteína-cinase ativada por

FIGURA 23-38 O papel da proteína-cinase ativada por AMP (AMPK) na manutenção da homeostasia energética. O ADP produzido por reações sintéticas é convertido em ATP e AMP pela adenilil-cinase. O AMP ativa a AMPK, que regula reciprocamente as vias de consumo de ATP e de geração de ATP por meio da fosforilação de enzimas-chave (Figura 23-39). Condições ou agentes que inibem a produção de ATP por reações catabólicas (como hipoxia, falta de glicose, venenos metabólicos) aumentam a [AMP], ativam AMPK e estimulam o catabolismo. Atividades celulares ou de organismos que consomem ATP (contração muscular, crescimento) aumentam a [AMP] e estimulam reações catabólicas para repor o ATP. Quando a [ATP] é alta, o ATP impede a ligação do AMP à AMPK, reduzindo, assim, a atividade da AMPK e tornando o catabolismo mais lento.

AMP monitora a energia e o estado dos nutrientes *em células individuais* e transfere o metabolismo para geração de energia quando necessário para manter a homeostasia metabólica. Além disso, ao responder a uma variedade de sinais hormonais, a AMPK no hipotálamo atua para manter o *organismo todo* em equilíbrio energético (Figura 23-12).

A AMPK monitora o estado energético de uma célula por meio de sua resposta à [AMP]. Muitas das reações que consomem energia nas células convertem o ATP em ADP

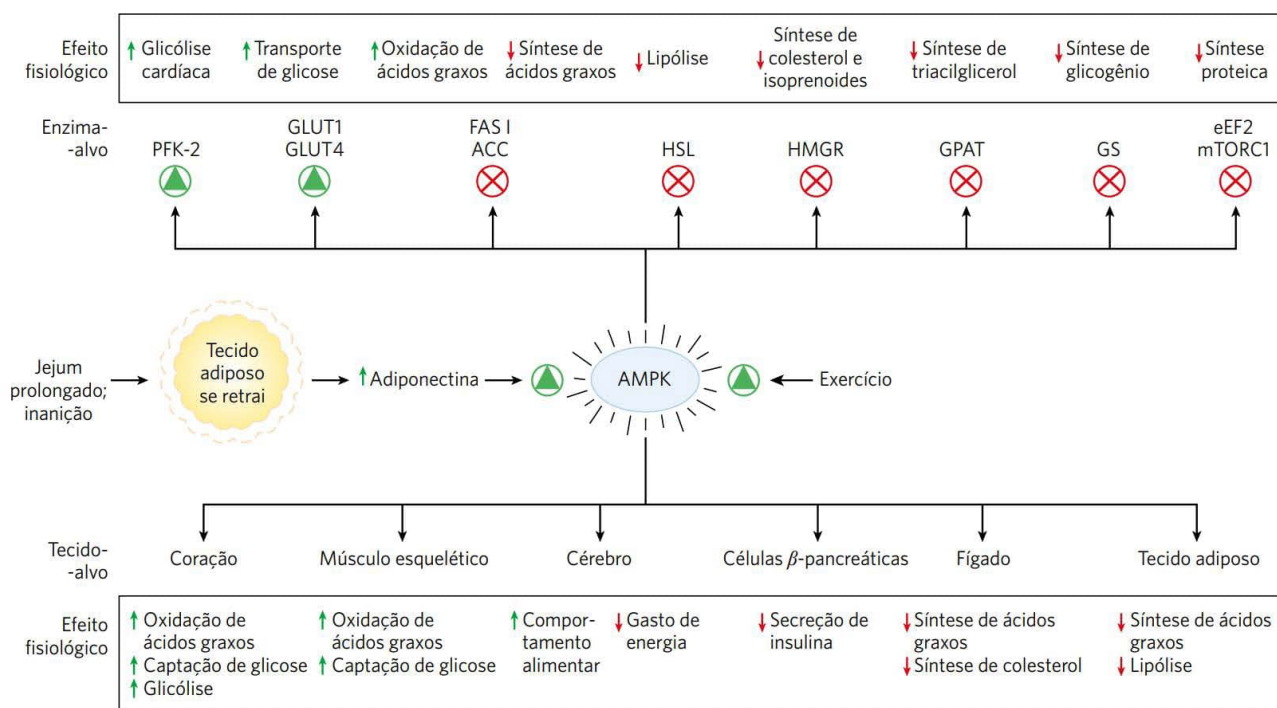


FIGURA 23-39 Formação de adiponectina e suas ações por meio da AMPK. O jejum prolongado ou a inanição diminui as reservas de triacilglicerol no tecido adiposo, o que desencadeia a produção de adiponectina e a liberação de adipócitos. A adiponectina age por meio de seus receptores de membrana plasmática em vários tipos de células e órgãos para inibir processos consumidores de energia e estimular processos de produção de energia. Ela atua no cérebro para estimular o comportamento alimentar e inibir a atividade física que consome energia, e na gordura marrom, para inibir a termogênese. A adiponectina exerce seus efeitos metabólicos por ativar a AMPK, que regula (por fosforilação) enzimas específicas em processos metabólicos essenciais (ver Figura 15-8). PFK-2, fosfofrutocinase 2; GLUT1 e GLUT4, transportadores de glicose; FAS I, ácido graxo-sintase 1; ACC, acetil-CoA-carboxilase; HSL, lipase sensível a hormônio; HMGR, HMG-CoA-redutase; GPAT, aciltransferase; GS, glicogênio-sintase; eEF2, fator de alongação 2 de eucariotos (necessário para a síntese proteica; ver Capítulo 27); mTORC1, alvo de rapamicina de mamíferos (proteína-cinase que regula a síntese proteica com base na disponibilidade de nutrientes; ver Figura 23-41). Fármacos como as tiazolidinedionas ativam o fator de transcrição PPARγ (ver Figuras 23-42 e 23-43), o qual promove a síntese da adiponectina, ativando indiretamente a AMPK. O exercício também estimula a AMPK, por meio da conversão de ATP em ADP e AMP.

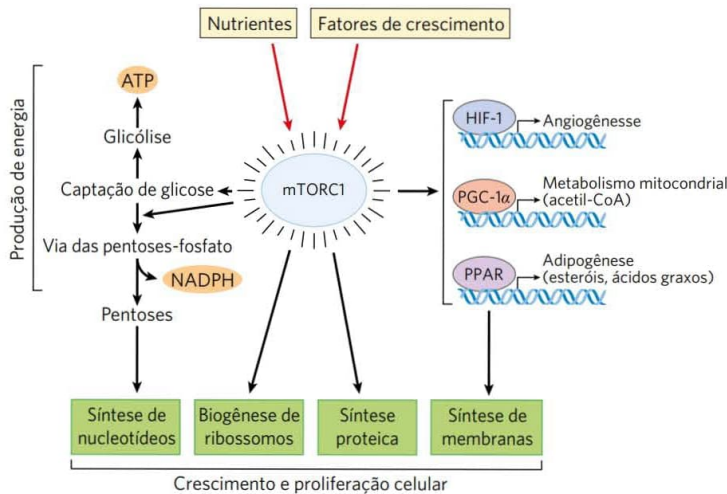


FIGURA 23-41 A mTORC1 estimula o crescimento e a proliferação celular quando nutrição adequada está disponível.

A mTORC1 é uma proteína-quinase Ser/Thr ativada por fatores de crescimento e metabólitos que sinalizam estado de nutrição adequada. Pela fosforilação de proteínas-alvo essenciais, a mTORC1 ativa a produção de energia (ATP e NADPH) para a biossíntese e estimula a síntese de proteínas e lipídeos, permitindo o crescimento e a proliferação celular. PPP, via das pentoses-fosfato; HIF-1, fator de transcrição induzido por hipoxia; PGC-1 α , coativador 1 α da PPAR γ ; PPAR, receptores ativados por proliferadores de peroxissomos; FA, ácido graxo. [Fonte: informação de J. L. Yecies e B. D. Manning, *J. Mol. Med.* 89:221, 2011, Fig. 2.]

da síntese de lipídeos e da proliferação mitocondrial (**Figura 23-41**). O jejum resulta na inativação de mTORC1 pela AMPK, levando ao aumento da degradação de proteínas e de glicogênio no fígado e no músculo e à mobilização de TAG no tecido adiposo. A ativação crônica de mTORC1 pelo excesso de alimentação resulta em excesso de deposição de TAG no tecido adiposo, bem como no fígado e no músculo, o que pode contribuir para a insensibilidade à insulina e ao diabetes tipo 2 (ver Seção 23.5). Mutações que levam à produção de mTORC1 constantemente ativada são também comumente associadas com cânceres em seres humanos.

A dieta regula a expressão de genes essenciais para a manutenção da massa corporal

As proteínas de uma família de fatores de transcrição ativados por ligantes, os **receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPAR)**, respondem a mudanças nos lipídeos da dieta com a alteração da expressão de genes envolvidos no metabolismo de gorduras e de carboidratos. Esses fatores de transcrição foram reconhecidos inicialmente por seu papel na síntese de peroxissomos – daí seu nome. Seus ligantes normais são ácidos graxos ou seus derivados, mas também se ligam a agonistas sintéticos e podem ser ativados experimentalmente por manipulação genética. PPAR α , PPAR δ e PPAR γ são membros dessa superfamília de receptores nucleares. Eles agem no núcleo, formando heterodímeros com outro receptor nuclear, o RXR (do inglês, *retinoid X receptor* [receptor retinoide X]), ligando-se a regiões reguladoras no DNA próximas aos genes sob seu controle e alterando a taxa de transcrição desses genes (**Figura 23-42**).

Precisa-se do PPAR γ , expresso em vários tecidos, incluindo tecido adiposo (marrom, bege e branco), para ativar genes necessários à diferenciação de fibroblastos em adipócitos e genes que codificam proteínas necessárias para a síntese de lipídeos e armazenamento em adipócitos (**Figura 23-43**). O PPAR γ é ativado pelos fármacos do tipo tiazolidinedionas, que são usados no tratamento do diabetes tipo 2 (discutido adiante).

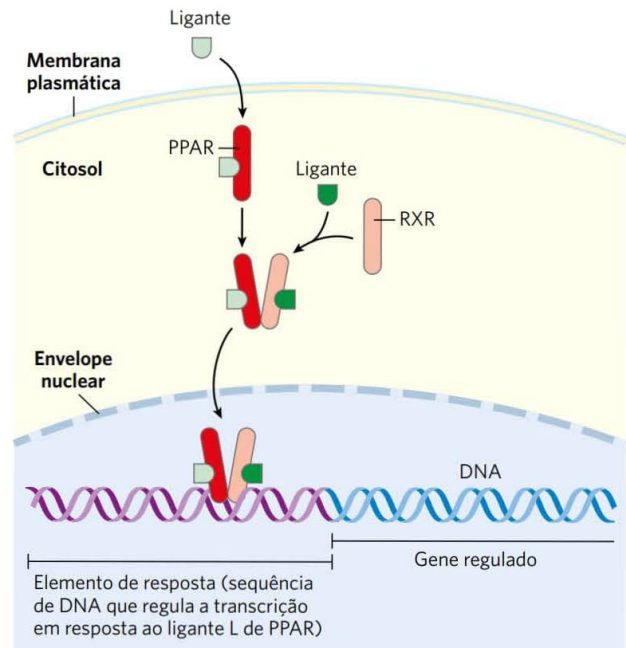
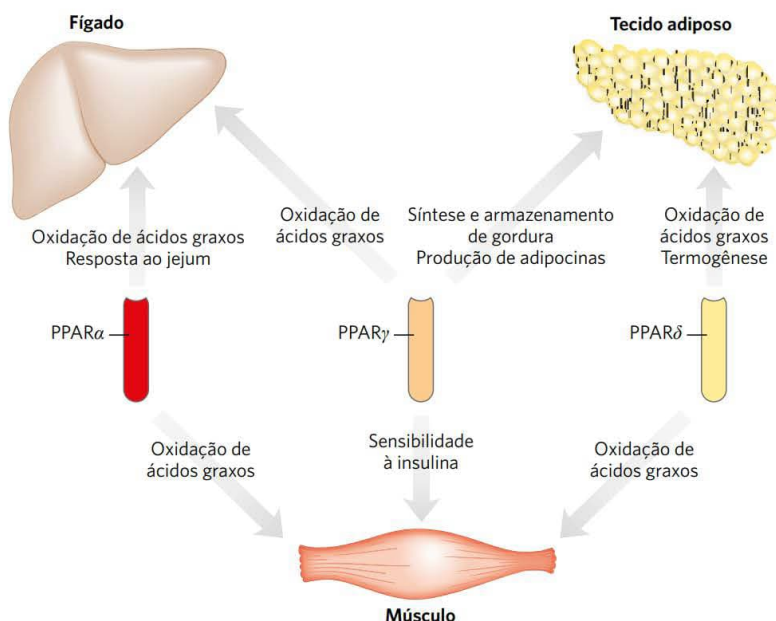


FIGURA 23-42 Modo de ação dos PPAR. Os PPAR são fatores de transcrição que, ao interagirem com seu ligante cognato (L), formam heterodímeros com o receptor nuclear RXR. O dímero liga-se a regiões específicas do DNA, conhecidas como elementos de resposta, estimulando a transcrição dos genes dessas regiões. [Fonte: informação de R. M. Evans et al., *Nature Med.* 10:355, 2004, Fig. 3.]

**FIGURA 23-43 Integração metabólica pelos PPAR.**

As três isoformas do PPAR regulam a homeostasia da glicose e dos lipídeos por meio de seus efeitos coordenados sobre a expressão gênica no fígado, no músculo e no tecido adiposo. PPAR α e PPAR δ (e sua isoforma intimamente relacionada PPAR β) regulam a utilização de lipídeos; o PPAR γ regula o armazenamento de lipídeos e a sensibilidade à insulina de vários tecidos.

O PPAR δ e o PPAR β são reguladores-chave da oxidação de gorduras, os quais agem detectando alterações na dieta lipídica. O PPAR δ age no fígado e no músculo, estimulando a transcrição de, pelo menos, nove genes que codificam proteínas da β -oxidação e para dissipação de energia por meio do desacoplamento das mitocôndrias. Camundongos normais superalimentados com dieta altamente lipídica acumulam quantidades massivas de tecido adiposo branco, e as gotículas de gordura acumulam-se no fígado. No entanto, quando o mesmo experimento de superalimentação é realizado com camundongos com PPAR δ geneticamente alterado para estar sempre ativo, o acúmulo de gordura não ocorre. Em camundongos com receptor de leptina não funcional (*db/db*), o PPAR δ ativado previne o desenvolvimento de obesidade. O estímulo pelo PPAR δ da degradação dos ácidos graxos em mitocôndrias desacopladas causa depleção das gorduras, perda de peso e termogênese. Visto dessa forma, a termogênese é tanto um meio de o organismo se manter aquecido quanto uma defesa contra a obesidade. Claramente, o PPAR δ é um alvo em potencial para fármacos no tratamento da obesidade.

O comportamento alimentar a curto prazo é influenciado por grelina, PYY₃₋₃₆ e canabíoides

O hormônio peptídico **grelina** é produzido nas células que revestem o estômago. Originalmente, foi reconhecido como o estímulo para a liberação do hormônio do crescimento (*ghre* é a raiz protoindo-europeia de “crescer”); posteriormente, mostrou-se um potente estimulante do apetite, que funciona em escala de tempo mais curta (entre as refeições) do que a leptina e a insulina. Os receptores de grelina estão localizados na hipófise (provavelmente mediando a liberação do hormônio do crescimento) e no hipotálamo (afetando o apetite), bem como no músculo cardíaco e no tecido adiposo. A grelina age através do GPCR para produzir o segundo mensageiro IP₃, que media a ação hor-

monal. A concentração de grelina no sangue flutua notavelmente ao longo do dia, atingindo um pico logo antes de uma refeição e caindo drasticamente logo após a refeição (Figura 23-44). A injeção de grelina em seres humanos produz sensação imediata de intensa fome. Pessoas com a síndrome de Prader-Willi, cujos níveis de grelina no sangue são extremamente altos, têm apetite incontrolável, levando à extrema obesidade que, com frequência, resulta em morte antes dos 30 anos.

O PYY₃₋₃₆ é um hormônio peptídico (34 resíduos de aminoácidos) secretado por células endócrinas que revestem o intestino delgado e o colo em resposta à chegada de alimento vindo do estômago. O nível de PYY₃₋₃₆ no sangue aumenta após uma refeição e se mantém alto por algumas horas. Ele é levado pelo sangue para o núcleo arqueado, onde age nos neurônios orexigênicos, inibindo a liberação de NPY e reduzindo a fome (Figura 23-36). Seres humanos injetados com PYY₃₋₃₆ sentem pouca fome e se alimentam menos que o normal por cerca de 12 horas.

A **O-GlcNAc-transferase (OGT)** é uma enzima que age para diminuir o apetite. Essa enzima transfere o amino-açúcar *N*-acetil-glicosamina (p. 247) do nucleotídeo glicosilado UDP-GlcNAc para o grupo hidroxila das cadeias laterais de Ser e Thr. Seus alvos incluem proteínas sinápticas de neurônios no núcleo paraventricular do hipotálamo. Quando a OGT é inibida em camundongos experimentais, eles comem quase duas vezes mais do que os animais-controle e triplicam sua massa adiposa em duas semanas. A atividade da OGT em camundongos-controle aumenta quando a comida está disponível, levando a um modelo de saciedade em que o acesso a alimentos ativa a OGT em neurônios críticos do núcleo paraventricular. Após um tempo (o período de alimentação), a modificação pós-traducional das proteínas sinápticas por OGT desencadeia potenciais de ação que transmitem a mensagem: pare de comer! Sem essa mensagem, o animal come duas vezes mais e fica obeso.

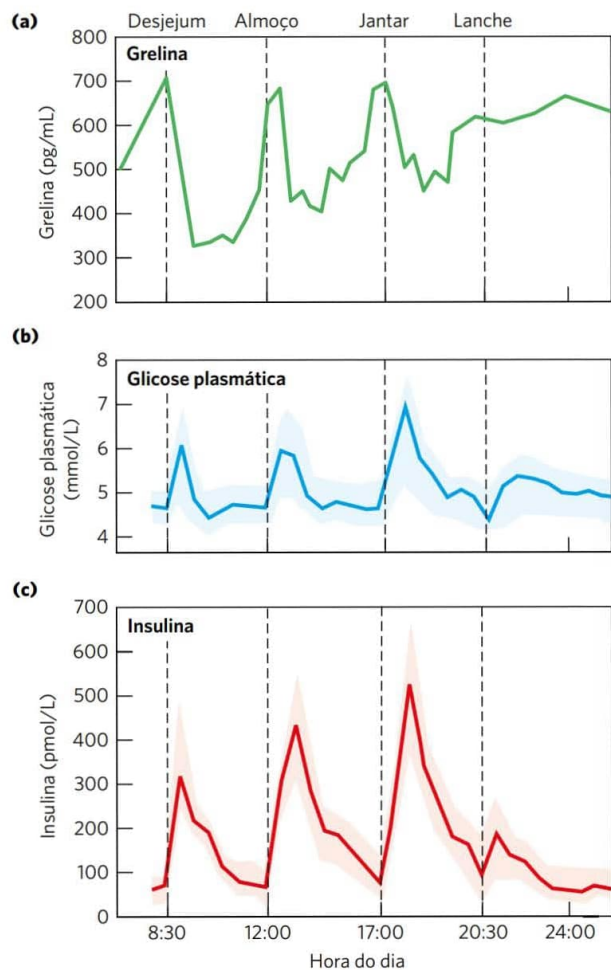


FIGURA 23-44 Variação das concentrações sanguíneas de glicose, grelina e insulina com relação aos horários das refeições. (a) Os níveis plasmáticos de grelina aumentam bastante pouco *antes* do horário habitual das refeições (às 7h desjejum, 12h almoço, 17h30min jantar) e caem precipitadamente logo após as refeições, paralelamente aos sentimentos subjetivos de fome. (b) A glicose plasmática aumenta acentuadamente *após* uma refeição, (c) seguida imediatamente por um aumento dos níveis de insulina, em resposta ao aumento da glicose no sangue. [Fontes: (a, c) dados de D. E. Cummings et al., *Diabetes* 50:1714, 2001, Fig. 1. (b) Dados de M. D. Feher e C. J. Bailey, *Br. J. Diabet. Vasc. Dis.* 4:39, 2004.]

Os **endocanabinoides** (Figura 23-45) são mensageiros lipídicos que atuam por meio de receptores específicos no cérebro e em todo o sistema nervoso para aumentar o apetite, aumentar a resposta sensorial aos alimentos (principalmente alimentos doces e gordurosos) e elevar o humor. Quando o alimento entra na boca, os sinais neuronais viajam para o cérebro e, a partir daí, através do nervo vago para o intestino, que, então, produz e libera os endocanabinoides. Os receptores para endocanabinoides são os GPCR, os quais controlam os canais iônicos dos neurônios sensoriais, alterando seus potenciais de membrana e enviando sinais para o cérebro. Alimentos palatáveis percebidos dessa forma motivam consumo ainda maior desse alimento. O sabor das gorduras (que apresentam particularmente alto conteúdo

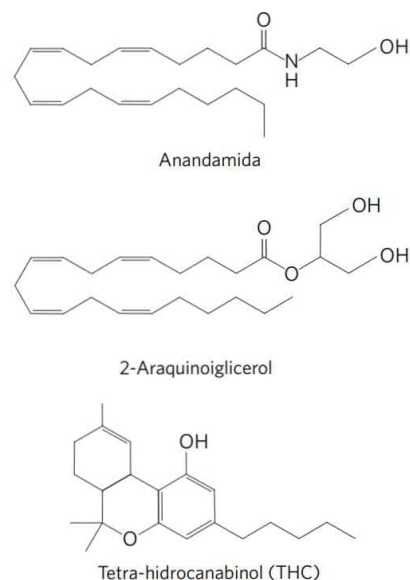


FIGURA 23-45 Canabinoides. Dois endocanabinoides produzidos por animais e o produto vegetal psicoativo tetra-hidrocanabinol (THC) encontrado na maconha.

calórico) causa a liberação de canabinoides, o que, efetivamente, desencadeia um consumo adicional. Bem conservado em todas as espécies de vertebrados, este sistema provavelmente evoluiu para maximizar a ingestão de alimentos e para evitar a fome. Nos mamíferos, a ação canabinoide estimula o aumento da massa gorda e inibe a perda de energia por atividade motora ou termogênese. Os receptores canabinoides também medeiam os efeitos psicoativos do tetra-hidrocanabinol (Figura 23-45), um dos ingredientes ativos da maconha, conhecido por seu efeito estimulante sobre o apetite (“a fome”).

Os simbioss microbianos do intestino influenciam no metabolismo energético e na adipogênese

Um homem adulto hospeda cerca de 10^{14} células microbianas que habitam o intestino. Esses micróbios funcionam como um importante órgão endócrino, produzindo uma variedade de metabólitos com efeitos profundos no metabolismo do hospedeiro, no comportamento alimentar e na massa corporal. Os indivíduos magros e os obesos têm diferentes combinações de simbioss microbianos no intestino. A investigação dessa observação levou à descoberta de que os micróbios do intestino liberam produtos de fermentação – os ácidos graxos de cadeia curta acetato, propionato, butirato e lactato – que entram na corrente sanguínea e desencadeiam alterações metabólicas no tecido adiposo (Figura 23-46). O propionato, por exemplo, impulsiona a expansão do TAB atuando nos GPCR (GPR41 e GPR43) nas membranas plasmáticas de vários tipos de células, incluindo os adipócitos. Esses receptores desencadeiam a diferenciação de células precursoras (pré-adipócitos) em adipócitos e inibem a lipólise em adipócitos existentes, levando a um aumento na massa de TAB – isto é, obesidade. Os micróbios intestinais também convertem os ácidos biliares primários,

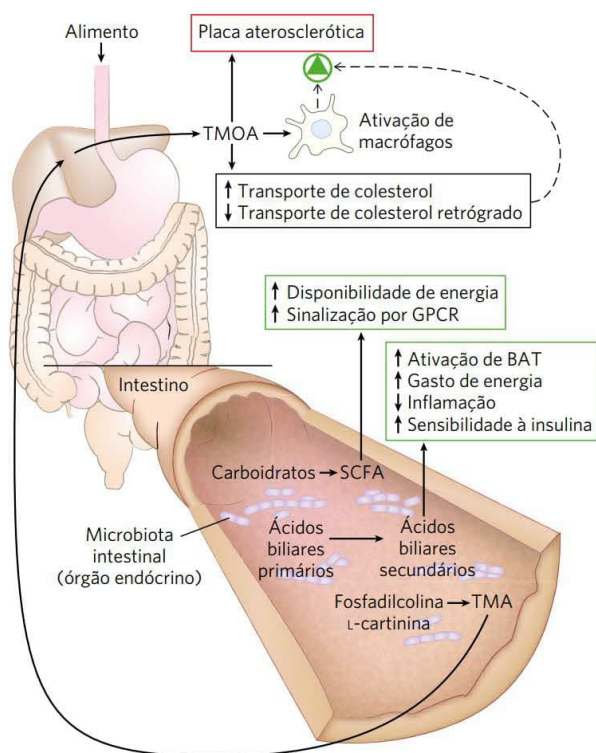


FIGURA 23-46 Efeitos do metabolismo dos micróbios intestinais na saúde. O enorme número e diversidade de microrganismos (a microbiota) no colo gera produtos metabólicos que podem ter efeitos significativos sobre a saúde, tanto positivos quanto negativos. Por exemplo, o metabolismo de ácidos biliares primários pela microbiota produz produtos secundários que atuam por meio de receptores nucleares para estimular a termogênese no tecido adiposo marrom (TAM) e aumentar o consumo de energia e a sensibilidade à insulina, enquanto reduzem a inflamação. O metabolismo de carboidratos não digeridos pela microbiota produz ácidos graxos de cadeia curta (SCFA) que sinalizam a expansão do tecido adiposo branco do hospedeiro (TAB), promovendo a obesidade. SCFA produzidos pela microbiota são também uma fonte de energia prontamente metabolizável para o hospedeiro. A produção microbiana do SCFA propionato evita a lipogênese no fígado e reduz o colesterol sanguíneo, ambos favoráveis à saúde. Por outro lado, a conversão metabólica da fosfatidilcolina e da L-carnitina em trimetilamina (TMA), e sua posterior conversão no fígado em N-óxido de trimetilamina (TMAO), resulta em alterações mediadas por receptores no transporte de colesterol e na atividade macrófaga. A combinação do transporte alterado de colesterol e do aumento da atividade macrófaga pode levar à formação de placa aterosclerótica (Figura 21-46). Entender como os indivíduos podem alcançar e manter um equilíbrio saudável da microbiota é um grande desafio para o futuro.

sintetizados no fígado, nos ácidos biliares secundários de-soxicolato e litocolato, que entram na corrente sanguínea e atuam por meio de GPCR e receptores de esteroides para ativar os adipócitos beges, a fim de produzir UCP1 e aumentar o gasto de energia.

Estes resultados levantam a possibilidade de prevenir a obesidade, alterando a composição da comunidade microbiana no intestino. Isso pode ser conseguido adicionando-se espécies microbianas, diretamente ao intestino, (**probióticos**), que desfavorecem a adipogênese ou adicionando-se espécies microbianas aos nutrientes da dieta (**prebióticos**)

que favorecem a dominância dos micróbios probióticos. Por exemplo, experiências em camundongos mostraram que os frutanos, polímeros de frutose que são indigeríveis pelos animais, favorecem uma comunidade microbiana específica. Quando esta combinação de microrganismos está presente, o armazenamento de gordura no TAB e no fígado diminui, e não há nenhuma diminuição na sensibilidade à insulina que esteja associada à obesidade e à deposição de lipídeos no fígado (ver a seguir). Os pesquisadores transplantaram material fecal de um rato magro para um gordo e descobriram que uma nova coleção de micróbios se estabeleceu no intestino do animal receptor, o qual perdeu peso.

As células endócrinas que revestem o trato intestinal secretam peptídeos – o anorexigênico PYY₃₋₃₆ e o GLP-1 e a grelina orexigênica – que modulam a ingestão de alimentos e o gasto de energia. A interação com micróbios específicos do intestino, ou com seus produtos de fermentação, pode desencadear a liberação desses peptídeos. Entender como a dieta e os simbiontes microbianos interagem para afetar o metabolismo energético e a adipogênese é um ponto importante para entender o desenvolvimento da obesidade, da síndrome metabólica e do diabetes tipo 2.

Provavelmente, esse sistema interligado de controles neuroendócrinos da ingestão de alimento e do metabolismo evoluiu como proteção contra a fome e para eliminar o acúmulo contraproducente de gordura (obesidade extrema). A dificuldade que a maioria das pessoas encontra na tentativa de perder peso é prova da admirável efetividade desses controles.

RESUMO 23.4 Obesidade e regulação da massa corporal

- A obesidade está se tornando comum nos Estados Unidos e em outros países desenvolvidos, e predispõe a população a várias condições que ameaçam a vida, incluindo doença cardiovascular e diabetes tipo 2.
- O tecido adiposo produz leptina, hormônio que regula o comportamento alimentar e o gasto de energia, de forma a manter as reservas adequadas de gordura. A produção e a liberação de leptina aumentam com o número e o tamanho dos adipócitos.
- A leptina age em receptores no núcleo arqueado do hipotálamo, causando a liberação dos peptídeos anorexigênicos (supressores de apetite), incluindo o α -MSH, que age no cérebro, de modo a inibir o comportamento alimentar. A leptina também estimula a ação do sistema nervoso simpático sobre os adipócitos, levando ao desacoplamento da fosforilação oxidativa mitocondrial, com consequente termogênese.
- O mecanismo de transdução de sinal da leptina envolve a fosforilação do sistema JAK-STAT. Fosforiladas pela JAK, as STAT ligam-se a regiões reguladoras no DNA nuclear e alteram a expressão de genes que codificam proteínas que ajustam o nível da atividade metabólica e determinam o comportamento alimentar. A insulina age em receptores no núcleo arqueado, com resultados semelhantes aos causados pela leptina.
- O hormônio adiponectina estimula a captação e a oxidação de ácidos graxos e inibe sua síntese. Ele também sensibiliza o músculo e o fígado à insulina. As ações da

adiponectina são mediadas pela AMPK, que é também ativada por baixas [AMP] e exercício.

- A grelina, hormônio produzido no estômago, age sobre neurônios orexigênicos (estimulantes do apetite) no núcleo arqueado, provocando fome antes de uma refeição. O PYY₃₋₃₆, um hormônio peptídico do intestino, age no mesmo local para reduzir a fome após uma refeição. Os endocanabinoides sinalizam a disponibilidade de alimentos doces ou gordurosos e estimulam seu consumo.
- Os simbiontes microbianos no intestino produzem produtos de fermentação e ácidos biliares secundários. Eles influenciam a liberação de hormônios intestinais que regulam a massa corporal.

23.5 Obesidade, síndrome metabólica e diabetes tipo 2



No mundo industrializado, onde a oferta de alimentos é mais do que suficiente, existe uma crescente epidemia de obesidade e de diabetes tipo 2 associado a ela. Cerca de 300 milhões de pessoas em todo o mundo têm diabetes atualmente, e projeções razoáveis preveem um aumento drástico no número de casos na próxima década, em consequência da epidemia mundial de obesidade. A patologia do diabetes inclui doença cardiovascular, insuficiência renal, cegueira, neuropatia e má cicatrização nas extremidades que levam a amputações. No ano 2014, a mortalidade global devido ao diabetes foi estimada em 4 milhões, um número que, com certeza, aumentará nos próximos anos. É essencial compreender o diabetes tipo 2 e sua relação com a obesidade e encontrar medidas defensivas que previnam ou revertam os danos causados por essa doença. ■

No diabetes tipo 2, os tecidos tornam-se insensíveis à insulina



A característica do **diabetes tipo 2** é o desenvolvimento de resistência à insulina: estado no qual é necessária mais insulina para realizar os mesmos efeitos biológicos produzidos no estado sadio normal por uma quantidade mais baixa do hormônio. Nos estágios iniciais da doença, as células β -pancreáticas secretam insulina suficiente para superar a sensibilidade reduzida ao hormônio apresentada pelo músculo e pelo fígado. As células β , porém, eventualmente falham, e a falta de insulina torna-se aparente pela incapacidade do corpo de regular a glicose sanguínea. O estágio intermediário que precede o diabetes tipo 2 é, às vezes, denominado **síndrome metabólica**, ou **síndrome X**. Essa síndrome é caracterizada por obesidade, sobretudo no abdome; hipertensão (pressão sanguínea alta); lipídeos sanguíneos anormais (TAG e LDL altos, HDL baixa); glicose sanguínea levemente elevada; e capacidade reduzida de remover a glicose sanguínea em um teste de tolerância à glicose. As pessoas com síndrome metabólica apresentam, com frequência, alterações nas proteínas sanguíneas, associadas com coagulação anormal (alta concentração de fibrinogênio) ou inflamação (alta concentração de peptídeo C reativo, a qual aumenta com a resposta inflamatória). Cerca de 27% da população adulta nos Estados Unidos apresentam esses sintomas da síndrome metabólica.

O que predispõe os indivíduos com síndrome metabólica a desenvolverem diabetes tipo 2? De acordo com a hipótese da “toxicidade lipídica” (**Figura 23-47**), a ação do PPAR γ sobre os adipócitos normalmente mantém as células preparadas para sintetizar e armazenar triacilgliceróis – os adipócitos são sensíveis à insulina e produzem leptina, o que leva à deposição intracelular contínua de TAG. Contudo, o excesso de ingestão calórica em pessoas obesas faz os adipócitos ficarem repletos de TAG, tornando o tecido adiposo incapaz de receber uma demanda aumentada para estocar TAG. O tecido adiposo repleto de lipídeos libera fatores proteicos que atraem macrófagos que se infiltram no tecido, e podem chegar a representar, em massa, até 50% do tecido adiposo. Os macrófagos desencadeiam a resposta inflamatória, que prejudica a deposição dos ácidos graxos nos adipócitos e favorece sua liberação para o sangue. Esse excesso de ácidos graxos entra nas células hepáticas e musculares, onde é convertido em TAG, que se acumulam como gotículas lipídicas. Essa deposição ectópica (do grego, *ektopos*, “fora de lugar”) de TAG leva à insensibilidade à insulina no fígado e no músculo, a característica do diabetes tipo 2.

Além disso, de acordo com essa hipótese, ácidos graxos e TAG em excesso são tóxicos para o fígado e o músculo. Algumas pessoas são menos adaptadas geneticamente para lidar com essa carga de lipídeos ectópicos, sendo mais suscetíveis ao dano celular que leva ao desenvolvimento do diabetes tipo 2. A resistência à insulina provavelmente envolve prejuízo de vários mecanismos pelos quais o hormônio atua no metabolismo, que incluem alterações nos níveis proteicos e alterações nas atividades das enzimas de sinalização e dos fatores de transcrição. Por exemplo, tanto a síntese de adiponectina pelos adipócitos como seus níveis sanguíneos decrescem com a obesidade e aumentam com a perda de peso.

Sabe-se que vários fármacos efetivos no aumento da sensibilidade à insulina no diabetes tipo 2 agem sobre proteínas específicas nas vias de sinalização, e seus efeitos são consistentes com o modelo de lipotoxicidade. As **tiazolidinedionas** (usadas para tratar diabetes tipo 2; ver Figura 21-22) ligam-se ao PPAR γ , transformando um conjunto de genes específicos de adipócitos e promovendo a diferenciação de pré-adipócitos em pequenos adipócitos, aumentando, assim, a capacidade do corpo de absorver ácidos graxos da dieta e armazenando-os como TAG.

Existem fatores genéticos que claramente predispoem para o diabetes tipo 2. Embora 80% das pessoas com diabetes tipo 2 sejam obesas, a maioria das pessoas obesas não desenvolve a doença. Devido à complexidade dos mecanismos reguladores que foram discutidos neste capítulo, não é surpreendente que a genética do diabetes seja complexa, envolvendo interações entre genes variantes e fatores ambientais, incluindo dieta e estilo de vida. Pelo menos 10 *loci* genéticos já foram implicados com o diabetes tipo 2; variações isoladas em quaisquer desses “diabetogenes” causam um aumento relativamente pequeno na probabilidade de desenvolver a doença. Por exemplo, pessoas com a variante de PPAR γ no qual um resíduo de Ala substitui uma Pro na posição 12 têm um aumento leve, embora significativo, no risco de desenvolver a doença. ■

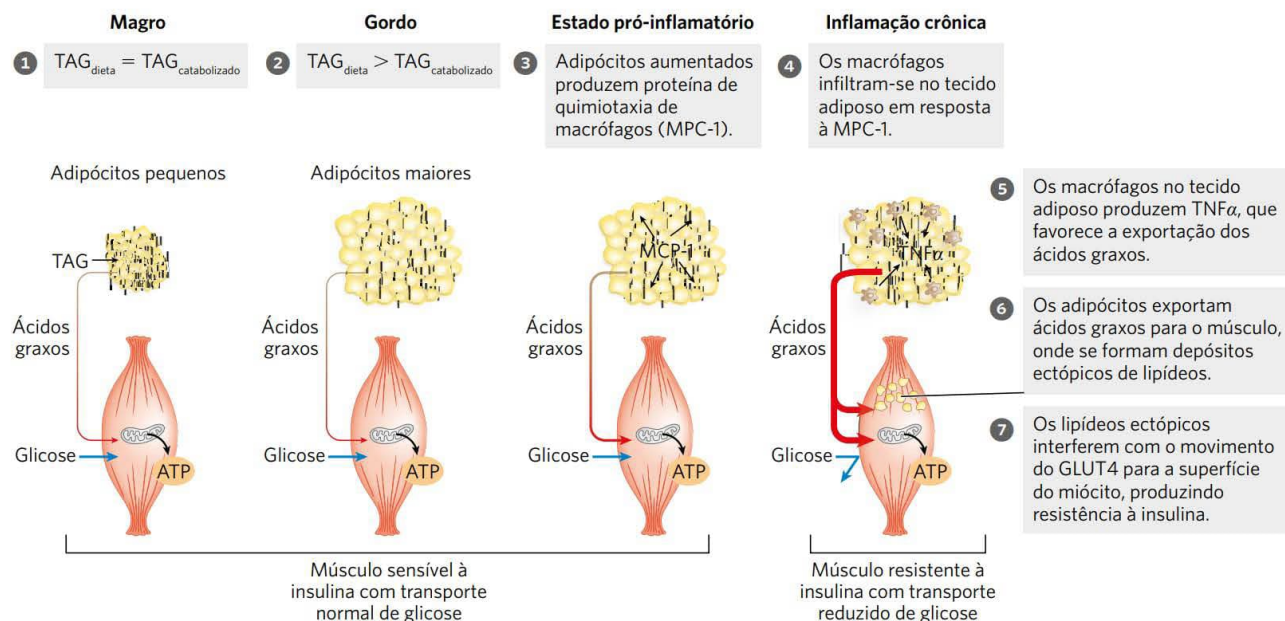


FIGURA 23-47 A sobrecarga de triacilgliceróis nos adipócitos desencadeia inflamação do tecido adiposo, deposição ectópica de lipídeos e resistência à insulina no músculo. Em um indivíduo de massa corporal saudável, a ingestão dietética de TAG é igual à oxidação de TAG para energia. Em indivíduos com sobrepeso, o excesso de ingestão calórica resulta em adipócitos aumentados, repletos de TAG e incapazes de estocar mais. Os adipócitos aumentados secretam MCP-1 (proteína 1 de quimiotaxia de monócitos) e atraem macrófagos. Os macrófagos infiltram o tecido adiposo e produzem $TNF\alpha$ (fator de necrose tumoral α), que desencadeia a degradação de lipídeos e a liberação de ácidos graxos no sangue. Os ácidos graxos entram nos miócitos, onde se acumulam em pequenas gotas lipídicas. Esse armazenamento lipídico ectópico no músculo de alguma forma causa resistência à insulina, talvez desencadeando proteínas-cinase ativadas por lipídeos que inativam algum elemento na via de sinalização da insulina. Os transportadores de glicose GLUT4 deixam a superfície do miócito, impedindo a entrada de glicose no músculo; o miócito tornou-se resistente à insulina. Ele não pode usar glicose no sangue como combustível, então os ácidos graxos são mobilizados a partir do tecido adiposo e se tornam o combustível primário. O influxo de ácidos graxos aumentado no músculo leva a uma deposição ectópica de lipídeos. Em alguns indivíduos, a resistência à insulina evolui para diabetes tipo 2. Outros indivíduos são geneticamente menos suscetíveis aos efeitos deletérios da deposição ectópica de lipídeos ou são geneticamente mais equipados para lidar com essa deposição e não desenvolvem o diabetes. [Fonte: informação de A. Guilherme et al., *Mol. Cell Biol.* 9:367, 2008, Fig. 1.]

0 diabetes tipo 2 é controlado com dieta, exercícios, medicamentos e cirurgia



Os estudos mostram que três fatores aumentam a saúde das pessoas com diabetes tipo 2: restrição alimentar, exercício regular e fármacos que aumentam a produção de insulina ou a sensibilidade ao hormônio. A restrição alimentar (e a perda de peso que a acompanha) reduz a carga total de ácidos graxos controláveis. A composição lipídica da dieta influencia, por meio de PPAR e outros fatores de transcrição, a expressão de genes que codificam proteínas envolvidas na oxidação de ácidos graxos e na queima de gordura. O exercício ativa a AMPK, como o faz a adiponectina; a AMPK altera o metabolismo no sentido da oxidação da gordura e, ao mesmo tempo, inibe sua síntese.

O exercício consome calorias e, dessa forma, contribui diretamente para a perda de peso. O exercício também aumenta a liberação de **irisina** do músculo para o sangue. A irisina aumenta a expressão dos genes da *UCP1* no TAB e estimula o desenvolvimento de adipócitos beges, de modo que, mesmo após o término do exercício, a energia continua a ser usada na termogênese.

Várias classes de fármacos são usados no tratamento do diabetes tipo 2 (Tabela 23-8), alguns dos quais discutimos

anteriormente neste capítulo. Sulfonilureias atuam nos canais K^+ dependentes de ATP nas células β para estimular a liberação de insulina. Biguanidas, como a metformina (Glicofage), ativam indiretamente a AMPK. Seu alvo direto é o complexo mitocondrial I; sua inibição pela metformina reduz a produção de ATP e aumenta a [AMP], que ativa a AMPK. A AMPK desencadeia a mudança para o metabolismo que conserva energia: aumento da captação e oxidação da glicose, aumento da mobilização e oxidação dos ácidos graxos e inibição da síntese de ácidos graxos e esteróis. Já observamos que as tiazolidinedionas atuam por meio do PPAR γ para aumentar a concentração de adiponectina no plasma e estimular a diferenciação de adipócitos, aumentando, assim, a capacidade de armazenamento de TAG.

Nos casos de obesidade extrema e diabetes tipo 2, o diabetes pode ser aliviado, ou mesmo revertido, pelo tratamento de perda de peso mais eficaz para a obesidade grave: a cirurgia bariátrica, que altera o caminho do alimento através do estômago e para a região superior do intestino delgado (duodeno) (**Figura 23-48**). Na derivação (ou *bypass*) gástrica em Y de Roux (RYGBP, do inglês, *Roux-en-Y gastric bypass*, nomeado por César Roux, o cirurgião suíço que desenvolveu o procedimento), o estômago é reduzido a uma pequena bolsa ligada ao esôfago, e a região média do intestino delgado (o jejuno) está liga-

TABELA 23-8 Tratamentos para o diabetes melito tipo 2

Intervenção/tratamento	Alvo direto	Efeito do tratamento
Perda de peso	Tecido adiposo; reduzir o conteúdo de TAG	Reduz a carga lipídica; aumenta a capacidade de armazenamento lipídico no tecido adiposo; restaura a sensibilidade à insulina
Exercício	AMPK, ativada pelo aumento de [AMP]/[ATP]	Auxilia na perda de peso (ver Figura 23-39)
Cirurgia bariátrica	Desconhecido	Leva à perda de peso, melhor controle da glicose sanguínea
Sulfonilureias: glipizida (Glucotrol), gliburida (Micronase), glimepirida (Amaryl)	Células β -pancreáticas; canais de K^+ bloqueados	Estimula a secreção de insulina pelo pâncreas (ver Figura 23-28)
Biguanidas: metformina (Glicofage)	AMPK, ativada	Aumenta a captação da glicose pelo músculo; reduz a produção de glicose no fígado
Tiazolidinedionas: troglitazona (Rezulin) ^a , rosiglitazona (Avandia) ^b , pioglitazona (Actos)	PPAR γ	Estimula a expressão de genes, potencializando a ação da insulina no fígado, no músculo e no tecido adiposo; aumenta a captação de glicose; reduz a síntese de glicose no fígado
Moduladores de GLP-1: exenatida (Byetta), sitagliptina (Januvia)	Peptídeo 1 do tipo glucagon, protease IV de dipeptídeo	Intensifica a secreção de insulina pelo pâncreas

^aRetirada do mercado voluntariamente devido aos efeitos colaterais.

^bPrescrições restritas a pacientes que não respondem a outros tratamentos devido ao possível aumento de risco de doença cardiovascular.

da diretamente à bolsa. A comida contorna a maior parte do estômago e do duodeno e vai principalmente para o “membro de Roux” do intestino. O ácido estomacal e as enzimas digestivas passam pelas porções contornadas do intestino para se unir a comida no canal comum. As pessoas que se submetem à cirurgia RYGBP não apenas experimentam uma perda de peso drástica, mas também sentem menos fome. De modo notável, essa cirurgia também reverte o diabetes tipo 2 em muitos casos. As explicações para esses efeitos provavelmente estão na comunicação alterada entre o intestino, o cérebro e outros órgãos. Isso pode resultar de alterações no tipo e na quantidade de hormônios peptídicos (como GLP-1 e PYY₃₋₃₆) secretados no intestino que sinalizam saciedade e inibem o comportamento alimentar. A última palavra sobre essa questão ainda não foi dita. ■

RESUMO 23.5 Obesidade, síndrome metabólica e diabetes tipo 2

- A síndrome metabólica, que inclui obesidade, hipertensão, lipídeos sanguíneos elevados e resistência à insulina, frequentemente é o prelúdio do diabetes tipo 2.
- A resistência à insulina que caracteriza o diabetes tipo 2 pode ser uma consequência do armazenamento anormal de lipídeos no músculo e no fígado, em resposta a uma ingestão lipídica que não pode ser acomodada no tecido adiposo.
- A expressão de enzimas para síntese lipídica está sob regulação firme e complexa. Os PPAR são fatores de transcrição que determinam a taxa de síntese de muitas enzimas envolvidas no metabolismo lipídico e na diferenciação dos adipócitos.

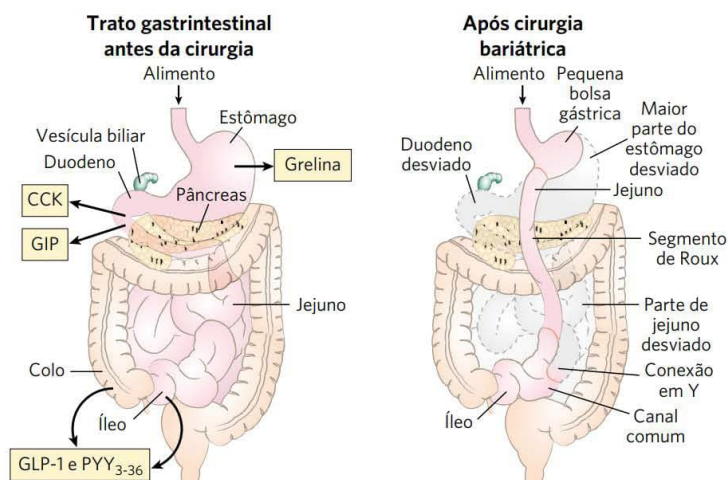


FIGURA 23-48 Cirurgia bariátrica. O sistema digestório produz hormônios peptídicos – grelina, colecistocinina (CCK), GIP, PYY₃₋₃₆ e GLP-1 – que afetam a homeostasia energética, incluindo a fome e a saciedade. São mostrados aqui o trato gastrointestinal humano normal (superior, à esquerda) e o trato gastrointestinal após a derivação gástrica em Y de Roux (à direita). Neste procedimento cirúrgico, a maior parte do estômago e a parte superior do intestino delgado (duodeno) são contornados. Isso resulta em perda de peso rápida (de mais de 2 kg por semana), bem como melhor regulação da glicemia em indivíduos com diabetes tipo 2. Um novo tratamento cirúrgico, a gastroplastia vertical com anel (não mostrada), produz resultados semelhantes. As bases bioquímicas e fisiológicas para esses efeitos não estão bem definidas, mas provavelmente incluem mudanças na sinalização hormonal peptídica que resultam do redirecionamento dos alimentos através do trato gastrointestinal.

- Os tratamentos efetivos do diabetes tipo 2 incluem exercício, dieta adequada e fármacos que aumentem a produção de insulina ou a sensibilidade ao hormônio. A alteração cirúrgica do trato gastrointestinal leva à perda de peso e muitas vezes reverte o diabetes tipo 2.

Termos-chave

Termos em negrito estão definidos no glossário.

hormônio 907	proteínas
sistema neuroendócrino 907	plasmáticas 929
radioimunoensaio (RIE) 908	canais de K^+ dependentes de ATP 933
ensaio de imunoadsorção ligado à enzima (ELISA) 908	fármacos de sulfonilureia 933
metabotrópico 910	glucagon 934
ionotrópico 910	cortisol 937
endócrino 911	diabetes melito 938
parácrino 911	diabetes tipo 1 938
autócrino 911	diabetes tipo 2 938
hormônios peptídicos 911	glicosúria 938
insulina 912	cetose 938
adrenalina 912	acidose 938
noradrenalina 912	cetoacidose 938
catecolaminas 912	teste de tolerância à glicose 938
hormônios eicosanoides 913	índice de massa corporal (IMC) 939
hormônios esteroides 913	adipocinas 939
hormônio da vitamina D (calcitriol) 913	leptina 940
hormônios retinoides 914	núcleo arqueado 940
hormônios da tireoide 914	orexigênico 941
óxido nítrico (NO^*) 915	neuropeptídeo Y (NPY) 941
NO-sintase 915	anorexigênico 941
hipotálamo 915	hormônio estimulante de α -melanócitos (α -MSH) 941
neuro-hipófise 915	JAK (Janus-cinase) 941
adeno-hipófise 915	STAT (transdutor de sinal e ativador da transcrição) 941
hormônio trófico (trofina) 915	proteína-cinase ativada por AMP (AMPK) 942
hepatócito 919	adiponectina 942
tecido adiposo branco (TAB) 922	mTORC1 944
adipócito 922	PPAR (receptor ativado por proliferador de peroxissomos) 945
tecido adiposo marrom (TAM) 923	grelina 946
proteína desacopladora 1 (UCP1) 923	PYY ₃₋₃₆ 946
termogênese 923	endocanabinoides 947
tecido adiposo bege 924	probióticos 948
miócito 925	prebióticos 948
eritrócito 929	síndrome metabólica 949
leucócito 929	tiazolidinedionas 949
linfócito 929	
plaquetas 929	
plasma sanguíneo 929	

Teste seu conhecimento

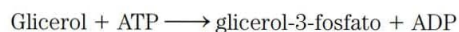
1. Atividade dos hormônios peptídicos Explique como dois hormônios peptídicos tão semelhantes estruturalmente quanto a ocitocina e a vasopressina podem ter efeitos tão diversos (ver Figura 23-10).

2. ATP e fosfocreatina como fontes de energia para o músculo Durante a contração muscular, a concentração de fosfocreatina no músculo esquelético diminui, ao passo que a concentração de ATP permanece razoavelmente constante. No entanto, em um experimento clássico, Robert Davies descobriu que, se tratasse primeiro o músculo com 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno (FDNB, p. 98), a concentração de ATP diminuiria rapidamente, ao passo que a concentração de fosfocreatina permaneceria constante durante uma série de contrações. Sugira uma explicação.

3. Metabolismo do glutamato no cérebro O tecido cerebral capta glutamato do sangue, transforma-o em glutamina e libera esta no sangue. Qual o resultado dessa conversão metabólica? Como ela ocorre? A quantidade de glutamina produzida no cérebro pode, na verdade, exceder a quantidade de glutamato que chega a partir do sangue. Como surge essa glutamina extra? (Dica: você pode querer revisar o catabolismo dos aminoácidos, no Capítulo 18; lembre-se de que o NH_4^+ é muito tóxico para o cérebro.)

4. As proteínas como combustível durante o jejum Quando as proteínas musculares são catabolizadas no músculo esquelético durante o jejum, quais os destinos dos aminoácidos?

5. Ausência da glicerol-cinase no tecido adiposo O glicerol-3-fosfato é necessário para a biossíntese de triacilgliceróis. Os adipócitos, células especializadas na síntese e na degradação de triacilgliceróis, não podem utilizar o glicerol diretamente, pois não têm a glicerol-cinase, que catalisa a reação



Como o tecido adiposo obtém o glicerol-3-fosfato necessário para a síntese de triacilgliceróis?

6. Consumo de oxigênio durante o exercício Um adulto sedentário consome cerca de 0,05 L de O_2 em 10 segundos. Um atleta, ao correr 100 m rasos, consome cerca de 1 L de O_2 em 10 segundos. Ao final da corrida, este corredor continua a respirar rapidamente (embora a frequência vá declinando) por alguns minutos, consumindo 4 L extras de O_2 acima do total consumido pela pessoa sedentária.

- Por que a necessidade de O_2 aumenta tanto durante a corrida?
- Por que a demanda por O_2 permanece alta após o final da corrida?

7. Deficiência de tiamina e função cerebral Pessoas com deficiência de tiamina apresentam alguns sinais e sintomas neurológicos característicos, incluindo perda dos reflexos, ansiedade e confusão mental. Por que a deficiência de tiamina se manifesta por alterações na função cerebral?

8. Potência dos hormônios Em condições normais, a medula da glândula suprarrenal humana secreta adrenalina ($C_9H_{13}NO_3$) em uma taxa suficiente para manter uma concentração de 10^{-10} M no sangue circulante. Para apreciar o que significa essa concentração, calcule, para uma piscina redonda com uma profundidade de água de 2 m, qual o diâmetro ne-

cessário para dissolver 1,0 g (cerca de uma colher de chá) de adrenalina para que a concentração se iguale à do sangue.

9. Regulação dos níveis hormonais no sangue A meia-vida da maioria dos hormônios no sangue é relativamente curta. Por exemplo, quando insulina marcada radioativamente é injetada em um animal, metade do hormônio marcado desaparece do sangue em 30 min.

- Qual a importância da inativação relativamente rápida dos hormônios circulantes?
- Em vista dessa rápida inativação, como é mantido constante o nível do hormônio circulante em condições normais?
- De que modo o organismo pode estabelecer rápidas mudanças no nível de um hormônio circulante?

10. Hormônios hidrossolúveis versus hormônios lipossolúveis Com base em suas propriedades físicas, os hormônios dividem-se em duas categorias: aqueles muito solúveis em água, mas relativamente insolúveis em lipídeos (p. ex., a adrenalina), e aqueles relativamente insolúveis em água, mas altamente solúveis em lipídeos (p. ex., os hormônios esteroides). Em seu papel como reguladores da atividade celular, a maior parte dos hormônios hidrossolúveis não entra em suas células-alvo. Os hormônios lipossolúveis, por sua vez, entram em suas células-alvo e, por fim, atuam no núcleo. Qual a correlação entre solubilidade, localização dos receptores e modo de ação dessas duas classes de hormônios?

11. Diferenças metabólicas entre o músculo e o fígado em situação de “luta ou fuga” Quando um animal se confronta com uma situação de lutar ou fugir, a liberação de adrenalina promove a degradação de glicogênio no fígado, no músculo esquelético e no músculo cardíaco. O produto final da degradação de glicogênio no fígado é a glicose; o produto no músculo esquelético é o piruvato.

- Qual a razão para haver diferentes produtos da degradação do glicogênio nos dois tecidos?
- Qual a vantagem, para um animal que deve lutar ou fugir, dessas vias específicas de degradação do glicogênio?



12. Secreção excessiva de insulina: o hiperinsulinismo Certos tumores malignos do pâncreas causam produção excessiva de insulina pelas células β . Pessoas afetadas apresentam tremores, fraqueza e fadiga, sudorese e fome.

- Qual o efeito do hiperinsulinismo sobre o metabolismo de carboidratos, aminoácidos e lipídeos no fígado?
- Quais as causas dos sintomas observados? Sugira a razão pela qual essa condição, se prolongada, leva a dano cerebral.

13. Termogênese causada por hormônios da tireoide Os hormônios da tireoide estão intimamente envolvidos na regulação da taxa metabólica basal. O tecido hepático de animais que receberam excesso de tiroxina mostra aumento no consumo de O_2 e na produção de calor (termogênese), porém a concentração de ATP no tecido é normal. Existem diferentes explicações para o efeito termogênico da tiroxina. Uma delas é que o excesso de tiroxina causa desacoplamento da fosforilação oxidativa na mitocôndria. Como pode esse efeito explicar as observações? Uma outra explicação sugere que a termogênese é devida a um aumento na utilização do ATP no tecido estimulado pela tiroxina. Essa explicação é razoável? Sim ou não? Por quê?

14. Função dos pró-hormônios Quais são as possíveis vantagens de sintetizar hormônios como pró-hormônios?

15. Fontes de glicose durante o jejum Um adulto típico usa cerca de 160 g de glicose por dia, das quais 120 g são usadas pelo cérebro. A reserva de glicose disponível (~ 20 g de glicose circulante e ~ 190 g de glicogênio) é adequada para cerca de um dia. Após a reserva ser depletada pelo jejum, como o corpo obtém glicose?

16. Camundongos parabióticos *ob/ob* Pesquisadores podem conectar os sistemas circulatórios de dois camundongos por meio de uma cuidadosa cirurgia, de modo que o mesmo sangue circula em ambos os animais. Nesses camundongos **parabióticos**, os produtos liberados no sangue por um animal atingem o outro animal via circulação compartilhada. Ambos os animais são livres para comer de forma independente. Se um camundongo mutante *ob/ob* (ambas as cópias do gene *OB* são defeituosas) e um camundongo normal *OB/OB* (duas cópias boas do gene *OB*) são unidos, tornando-se parabióticos, o que ocorre com o peso de cada camundongo?

17. Cálculo do índice de massa corporal Um professor de bioquímica corpulento pesa 118 kg e tem altura de 1,73 cm. Qual o índice de massa corporal desse professor? Quantos kg ele teria de perder para atingir um índice de massa corporal de 25 (normal)?

18. Secreção de insulina Quais os efeitos da exposição de células β -pancreáticas ao ionóforo de potássio valinomicina (Figura 11-42) sobre a secreção de insulina? Explique.

19. Efeitos de um receptor de insulina deletado Observe que uma linhagem de camundongos, sem o receptor específico de insulina hepático, apresenta hiperglicemia de jejum moderada (glicemia de 132 mg/dL, em comparação com 101 mg/dL nos controles) e hiperglicemia mais marcante no estado alimentado (glicemia de 363 mg/dL, em comparação com 135 mg/dL nos controles). Os camundongos apresentam níveis de glicose-6-fosfatase acima do normal no fígado e níveis elevados de insulina no sangue. Explique essas observações.



20. Decisões sobre a segurança do uso de fármacos O fármaco Avandia (rosiglitazona) é eficaz na redução da glicose no sangue em pacientes com diabetes tipo 2, porém, alguns anos depois de ter sido amplamente utilizado, parecia que o seu uso vinha com um risco aumentado de infarto do miocárdio. Em resposta, a Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos restringiu severamente as condições sob as quais ele poderia ser prescrito. Dois anos mais tarde, depois que estudos adicionais foram concluídos, a FDA suspendeu as restrições, e hoje o Avandia está disponível, por meio de prescrição médica, nos Estados Unidos, sem limitações especiais. Muitos outros países proíbem esse fármaco completamente. Se fosse sua responsabilidade decidir se esse fármaco deve permanecer no mercado (rotulado com avisos adequados quanto a seus efeitos colaterais) ou deve ser retirado, quais fatores levaria em conta ao tomar sua decisão?



21. Medicação para o diabetes tipo 2 Os fármacos acarbose (Precose) e miglitol (Glyset), utilizados no tratamento do diabetes melito tipo 2, inibem α -glicosidases da membrana em forma de escova do intestino delgado. Essas enzimas degradam oligossacarídeos resultantes da digestão do glicogênio ou do amido em monossacarídeos. Sugira um possível mecanismo para o efeito salutar desses fármacos em pessoas com diabetes. Quais efeitos colaterais, se for o caso, você esperaria desses fármacos? Por quê? (Dica: revisar a intolerância à lactose, p. 551.)

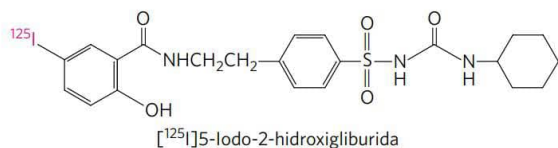
Problema de análise de dados

22. Clonando o receptor de sulfonilureia das células β -pancreáticas A gliburida, membro da família das sulfonilureias, mostrada na p. 933, é usada para tratar diabetes tipo 2. Esse fármaco se liga ao canal de K^+ dependente de ATP e o fecha, o que é mostrado nas Figuras 23-28 e 23-29.

- Considerando o mecanismo mostrado na Figura 23-28, o tratamento com gliburida resultaria em aumento ou diminuição da secreção de insulina pelas células β -pancreáticas? Explique o raciocínio utilizado.
- Como o tratamento com gliburida ajudaria a reduzir os sintomas do diabetes tipo 2?
- Você esperaria que a gliburida fosse útil para tratar o diabetes tipo 1? Explique sua resposta.

Aguilar-Bryan e colaboradores (1995) clonaram o gene para a subunidade receptora da sulfonilureia (SUR) do canal de K^+ dependente de ATP de *hamsters*. A equipe de pesquisa foi extremamente rigorosa ao assegurar que o gene clonado era, de fato, o gene que codificava a SUR. Aqui, consideramos como é possível para os pesquisadores demonstrarem que clonaram, na verdade, o gene de interesse, e não outro gene.

O primeiro passo foi obter a proteína SUR purificada. Como já se sabia, fármacos do tipo da gliburida ligam SUR com alta afinidade ($K_d < 10$ nM), e a SUR tem uma massa molecular de 140 a 170 kDa. Aguilar-Bryan e colaboradores utilizaram essa ligação de alta afinidade da gliburida para “etiquetar” a proteína SUR com marca radioativa, que serviria como marcador na purificação da proteína a partir de um extrato celular. Inicialmente, produziram um derivado radioativo da gliburida, utilizando iodo radioativo (^{125}I):



- Em estudos preliminares, o derivado da gliburida marcado com ^{125}I (doravante $[^{125}\text{I}]$ gliburida) mostrou ter a mesma K_d e as mesmas características de ligação que a gliburida original. Por que foi necessário demonstrar isso? (Quais possibilidades alternativas foram descartadas?)

Embora a $[^{125}\text{I}]$ gliburida ligue SUR com alta afinidade, uma quantidade significativa do fármaco marcado se dissociaria da proteína SUR durante a purificação. Para prevenir tal dissociação, a $[^{125}\text{I}]$ gliburida deveria estabelecer ligações cruzadas covalentes com a SUR. Há muitos métodos para se estabelecer essas ligações, e Aguilar-Bryan e colaboradores utilizaram luz UV. Quando moléculas aromáticas são expostas à luz UV de ondas curtas, entram em um estado excitado e facilmente formam ligações covalentes com moléculas próximas. Por meio de ligações cruzadas entre a proteína SUR e a gliburida marcada radioativamente, os pesquisadores simplesmente acompanhavam a radioatividade do ^{125}I para seguir a SUR ao longo do procedimento de purificação.

A equipe de pesquisa tratou células HIT (que expressam SUR) de *hamster* com $[^{125}\text{I}]$ gliburida e luz UV, purificou a proteína de 140 kDa marcada com ^{125}I e sequenciou seu segmento aminoterminal de 25 resíduos; eles encontraram a sequência PLAFCGTENHSAAYRVDQGVNNGC. Os investigadores produziram, então, anticorpos específicos para dois peptídeos curtos dessa sequência, um para a sequência PLAFCGTE e outro para a sequência HSAAYRVDQGV, e mostraram que esses anticorpos se ligavam à proteína purificada de 140 kDa marcada com ^{125}I .

- Por que foi necessário incluir essa etapa com ligação por anticorpos?

Em seguida, os pesquisadores projetaram iniciadores (*primers*) de PCR baseados nas sequências acima e depois clonaram um gene de uma biblioteca de cDNA de *hamster* que codificava uma proteína com essas sequências (ver Capítulo 9 sobre métodos de biotecnologia). O pressuposto cDNA de SUR clonado hibridizava com um mRNA de tamanho apropriado, presente em células que certamente continham SUR. O suposto cDNA para SUR não hibridizava com qualquer fração de mRNA isolado de hepatócitos, que não expressam SUR.

- Por que foi necessário incluir essa etapa de hibridização entre o suposto cDNA para SUR e mRNA?

Por fim, o gene clonado foi inserido e expresso em células COS, as quais normalmente não expressam o gene SUR. Os pesquisadores trataram essas células com $[^{125}\text{I}]$ gliburida, com ou sem um grande excesso de gliburida não marcada, expuseram as células à luz UV e mediram a radioatividade na proteína de 140 kDa produzida. Seus resultados são mostrados na tabela.

Experimento	Tipo celular	Suposto SUR cDNA adicionado?	Gliburida adicionada em excesso não marcada?	Marcação com ^{125}I de 140 kDa proteína
1	HIT	Não	Não	+ + +
2	HIT	Não	Sim	—
3	COS	Não	Não	—
4	COS	Sim	Não	+ + +
5	COS	Sim	Sim	—

- Por que no experimento 2 não foi observada a proteína de 140 kDa marcada com ^{125}I ?
- Como você usaria a informação da tabela para argumentar que o cDNA codificava SUR?
- Que outra informação você precisa obter para estar mais confiante de que clonou o gene SUR?

Referência

Aguilar-Bryan, L., C.G. Nichols, S.W. Wechsler, J.P. Clement, IV, A.E. Boyd, III, G. González, H. Herrera-Sosa, K. Nguy, J. Bryan e D.A. Nelson. 1995. Cloning of the β cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* 268:423–426.

Vias da informação

24	Genes e cromossomos	957
25	Metabolismo do DNA	987
26	Metabolismo do RNA	1035
27	Metabolismo das proteínas	1077
28	Regulação da expressão gênica	1127

A terceira e última parte deste livro investiga os mecanismos bioquímicos subjacentes a necessidades aparentemente contraditórias para a continuidade genética e a evolução dos organismos vivos. Qual é a natureza molecular do material genético? Como a informação genética é transmitida de uma geração para a próxima com grande fidelidade? De que modo as raras alterações, que são a matéria-prima da evolução, surgem no material genético? Como a informação genética, em última instância, expressa-se em sequências de aminoácidos na incrível variedade de moléculas proteicas de uma célula viva?

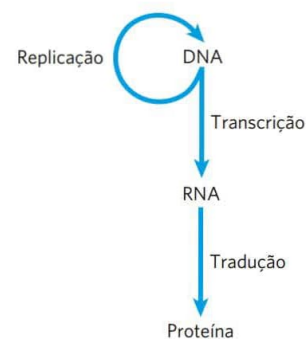
O conhecimento atual das vias da informação surgiu da convergência da genética, da física e da química na bioquímica moderna. Isso foi sintetizado pela descoberta da estrutura do DNA em dupla-hélice, postulada por James Watson e Francis Crick em 1953 (ver Figura 8-13). A teoria genética contribuiu para o conceito de codificação por genes. A física permitiu a determinação da estrutura molecular pela análise por difração de raios X. A química revelou a composição do DNA. O profundo impacto da hipótese de Watson-Crick surgiu da sua capacidade de explicar uma vasta gama de observações provenientes de estudos nessas diferentes disciplinas.

Isso revolucionou a nossa compreensão da estrutura do DNA e, inevitavelmente, estimulou questionamentos sobre a sua função. A estrutura em dupla-hélice, por si só, sugeria, com clareza, como o DNA deveria ser copiado, de forma que a informação nele contida pudesse ser transmitida de uma geração à outra. Esclarecimentos sobre como a informação no DNA é transformada em proteínas funcionais vieram com a descoberta do RNA mensageiro e do RNA transportador e com a decifração do código genético.

Esses e outros grandes avanços deram origem ao dogma central da biologia molecular, abrangendo os três maiores processos na utilização celular da informação genética. O primeiro é a replicação, a cópia do DNA parental para formar moléculas-filhas de DNA com sequências nucleotídicas idênticas. O segundo é a transcrição, o processo pelo qual partes da mensagem genética codificada pelo DNA são precisamente copiadas em RNA. O terceiro é a tradução, por meio da qual a mensagem genética codificada no RNA mensageiro é traduzida nos ribossomos em um polipeptídeo com uma sequência específica de aminoácidos.

A Parte III explora esses e outros processos a eles relacionados. No Capítulo 24, serão examinados a estrutura, a topologia e o empacotamento de cromossomos e genes. Os processos subjacentes ao dogma central serão elaborados nos Capítulos 25 a 27. Por fim, será abordada a regulação, examinando como é controlada a expressão da informação genética (Capítulo 28).

Um tema importante nesses capítulos é a complexidade inerente à biossíntese das macromoléculas que contêm informações. Ácidos nucleicos e proteínas são organizados em sequências específicas de nucleotídeos e aminoácidos,



O dogma central da biologia molecular, mostrando os caminhos gerais do fluxo da informação via replicação, transcrição e tradução. O termo “dogma” é uma designação incorreta, mantido apenas por razões históricas. Esse termo foi introduzido por Francis Crick em uma época em que poucas evidências apoiavam essas ideias, mas o “dogma” se tornou um princípio bem estabelecido.

e essa montagem representa nada menos do que preservar a expressão fidedigna do molde em que a vida se baseia. É possível supor que a formação das ligações fosfodiéster no DNA, ou das ligações peptídicas nas proteínas, seja uma proeza trivial para as células, considerando o arsenal de ferramentas enzimáticas e químicas descritas na Parte II. Entretanto, a estrutura de regras e padrões estabelecidos na nossa análise das vias metabólicas deve ser bastante aumentada para levar em consideração a informação molecular. Ligações devem ser formadas entre subunidades *específicas* nos biopolímeros informacionais, evitando a ocorrência ou a manutenção de erros na sequência. Isso tem um enorme impacto na termodinâmica, na química e na enzimologia dos processos biossintéticos. A formação de uma ligação peptídica necessita de uma quantidade de energia em torno de 21 kJ/mol de ligação e pode ser catalisada por enzimas relativamente simples. Para sintetizar uma ligação entre dois aminoácidos específicos em um ponto particular no polipeptídeo, no entanto, a célula investe em torno de 125 kJ/mol e usa mais de 200 enzimas, moléculas de RNA e proteínas especializadas. A química envolvida na formação da ligação peptídica não muda devido a essa necessidade, mas processos adicionais são acrescentados à reação básica para assegurar que a ligação peptídica seja formada entre aminoácidos específicos. A informação biológica é cara.

A interação dinâmica entre ácidos nucleicos e proteínas é outro tema central da Parte III. Moléculas de RNA regulatórias e catalíticas estão gradualmente ocupando um lugar mais proeminente no entendimento dessas vias (discutidas nos Capítulos 26 e 27). Entretanto, a maioria dos processos que formam as vias do fluxo de informação celular é catalisada e regulada por proteínas. A compreensão dessas enzimas e de outras proteínas pode ter tanto vantagens práticas como intelectuais, pois elas formam as bases da tecnologia do DNA recombinante (já apresentada no Capítulo 9).

A evolução novamente constitui um tema que paira acima dos outros. Muitos dos processos delineados na Parte III podem ser rastreados bilhões de anos e poucos podem ser rastreados até o Último Ancestral Comum Universal (LUCA, do inglês, *Last Universal Common Ancestor*). O ribossomo, a maior parte do aparato de tradução, e algumas partes da maquinaria de transcrição são compartilhadas por todos os organismos vivos nesse planeta. A informação genética é um tipo de relógio biológico que pode ajudar na definição de relacionamentos ancestrais entre as espécies. As vias de informação compartilhadas conectam o ser humano a cada uma das outras espécies atualmente vivas na Terra e a todas as espécies que vieram anteriormente. A investigação dessas vias está permitindo que cientistas abram vagarosamente a cortina do primeiro ato – os eventos que devem ter anunciado o início da vida na Terra.

Genes e cromossomos

24.1 Elementos cromossômicos 957

24.2 DNA supertorcido 963

24.3 A estrutura dos cromossomos 972

O tamanho das moléculas de DNA é um enigma biológico interessante. Uma vez que essas moléculas são, em geral, muito maiores do que as células e as partículas virais que as contêm (**Figura 24-1**), como é que elas cabem dentro das células ou dos compactados virais? Para tratar essa questão, é preciso transferir o foco da estrutura secundária do DNA, abordada no Capítulo 8, para o extraordinário grau de organização que envolve o empacotamento terciário do DNA dentro dos **cromossomos** – os repositórios da informação genética. O capítulo começa com uma análise dos elementos que compõem cromossomos celulares e virais e depois considera o tamanho e a organização desses cromos-

somos. Em seguida, discute a topologia do DNA, descrevendo a torção e a supertorção das moléculas de DNA. Por fim, considera as interações proteína-DNA que organizam cromossomos em estruturas compactas.

24.1 Elementos cromossômicos

O DNA celular contém genes e regiões intergênicas, e as duas regiões podem servir para desempenhar funções vitais às células. Os genomas mais complexos, como os das células de eucariotos, exigem níveis maiores de organização cromossômica, e isso se reflete nas características estruturais dos cromossomos. Agora serão considerados os diferentes tipos de sequências de DNA e os elementos estruturais dentro dos cromossomos.

Os genes são segmentos de DNA que codificam cadeias polipeptídicas e RNA

O conhecimento sobre os genes evoluiu de forma espantosa no último século. Antigamente, um gene era definido como a porção de um cromossomo que determina ou afeta um único traço ou **fenótipo** (propriedade visível), como a cor do olho. George Beadle e Edward Tatum propuseram uma definição molecular de gene em 1940. Depois de expor esporos do fungo *Neurospora crassa* a raios X e a outros agentes conhecidos por causarem danos ao DNA e alterações em sua sequência (**mutações**), eles detectaram linhagens mutantes de fungos com deficiência em uma ou em outra enzima, algumas vezes resultando em deficiência em uma via metabólica inteira. Beadle e Tatum concluíram que um gene é um segmento de material genético que determi-

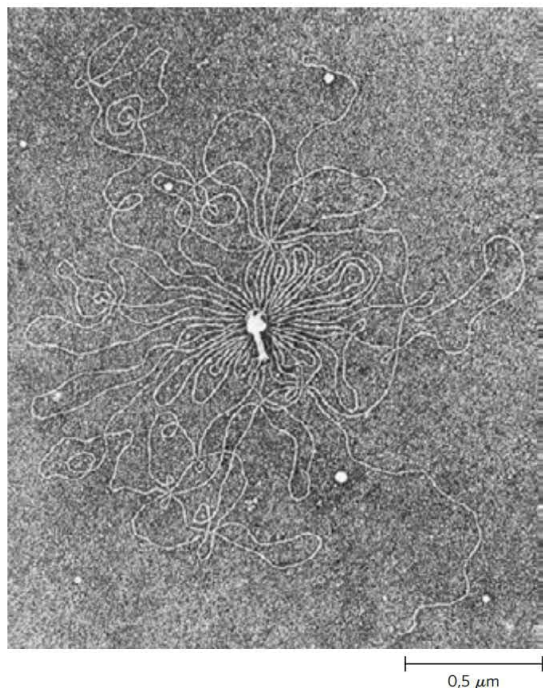


FIGURA 24-1 Capa proteica do bacteriófago T2 rodeada pela sua molécula de DNA única e linear. O DNA foi liberado pela lise da partícula do bacteriófago em água destilada, o que permitiu que o DNA se espalhasse pela superfície da água. Uma partícula de bacteriófago T2 intacta é constituída por uma cabeça que se afunila em uma cauda com a qual o bacteriófago se fixa à superfície exterior de uma célula bacteriana. Todo o DNA mostrado nessa micrografia eletrônica normalmente está compactado dentro da cabeça do fago. [Fonte: republicada, com permissão, da Elsevier, de "Preparation and length measurements of the total deoxyribonucleic acid content of T2 bacteriophages," por A. K. Kleinschmidt, et al. *Biochem. Biophys. Acta* 61, pp. 857-864, 1962; permissão transmitida por meio do Copyright Clearance Center, Inc.]

na ou codifica uma enzima: a hipótese **um gene-uma enzima**. Depois, esse conceito foi ampliado para **um gene-um polipeptídeo**, visto que muitos genes codificam proteínas não enzimas ou codificam um polipeptídeo de uma proteína com várias subunidades.



George W. Beadle, 1903-1989
[Fonte: National Library of Medicine/Science Photo Library/Science Source.]



Edward L. Tatum, 1909-1975
[Source: Corbis/UPI/Bettmann/Corbis.]

A definição bioquímica moderna de um gene é ainda mais precisa. Um **gene** é todo o DNA que codifica a sequência primária de algum produto gênico, que pode ser tanto um polipeptídeo quanto um RNA com funções catalíticas ou estruturais. O DNA também contém outros segmentos ou sequências com funções puramente regulatórias. As **sequências regulatórias** fornecem sinais que podem indicar o início ou o fim de um gene, ou influenciar a transcrição gênica, ou funcionar como ponto de início da replicação ou da recombinação (Capítulo 28). Alguns genes podem ser expressos de maneiras diferentes para produzir múltiplos produtos gênicos a partir de um único segmento de DNA; os mecanismos especiais de transcrição e tradução que permitem isso estão descritos nos Capítulos 26 a 28.

Pode-se estimar diretamente o tamanho médio mínimo dos genes que codificam uma proteína. Como está descrito em detalhes no Capítulo 27, cada um dos aminoácidos de uma cadeia polipeptídica é codificado por uma sequência consecutiva de três nucleotídeos em uma única cadeia de DNA (**Figura 24-2**), e esses “códon” estão organizados em uma sequência que corresponde à sequência de aminoácidos no polipeptídeo codificado por esse gene. Uma cadeia polipeptídica de 350 resíduos de aminoácidos (cadeia de tamanho médio) corresponde a 1.050 pb. Muitos genes de eucariotos e poucos em bactérias e arqueias são interrompidos por segmentos de DNA não codificantes e, portanto, são consideravelmente mais longos do que sugere esse cálculo simples.

Quantos genes existem em um único cromossomo? O cromossomo de *Escherichia coli*, um dos genomas de bactéria completamente sequenciado, é uma molécula de DNA circular (no sentido de alça sem extremidades, e não de um círculo perfeito) com 4.639.675 pb. Esses pares de bases codificam cerca de 4.300 genes para proteínas e 157 genes para moléculas de RNA estrutural ou catalítico. Entre os eucariotos, os aproximadamente 3,1 bilhões de pares de bases do genoma humano incluem quase 20 mil genes em 24 cromossomos diferentes.

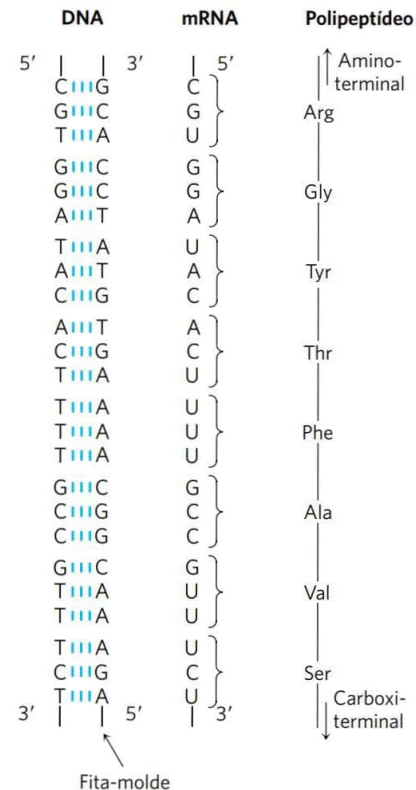


FIGURA 24-2 Colinearidade entre as sequências de nucleotídeos codificantes do DNA e do mRNA e as sequências de aminoácidos de uma cadeia polipeptídica. Os tripletes de unidades nucleotídicas no DNA determinam os aminoácidos de uma proteína por meio de um mRNA intermediário. Uma das cadeias de DNA serve como molde para a síntese de mRNA, que têm tripletes de nucleotídeos (códon) complementares aos do DNA. Em alguns genes de bactérias e em muitos genes de eucariotos, as sequências codificantes são interrompidas em intervalos por regiões não codificantes (denominadas íntrons).

As moléculas de DNA são muito mais longas do que o invólucro celular ou viral que as contém

Em geral, o comprimento do DNA dos cromossomos é várias ordens de magnitude maior do que as células ou os vírus nos quais ele se encontra (Figura 24-1; Tabela 24-1). Isso é verdadeiro para todas as classes de organismos ou de parasitas virais.

Vírus Os vírus não são organismos de vida livre. Ao contrário, são parasitas infecciosos que utilizam os recursos da célula hospedeira para desempenhar muitos dos processos de que necessitam para se propagar. Muitas partículas virais são constituídas por não mais do que um genoma (geralmente uma única molécula de RNA ou de DNA) envolto por capa proteica.

Quase todos os vírus de plantas e alguns vírus de bactérias e de animais têm genoma de RNA. Esses genomas tendem a ser especialmente pequenos. Por exemplo, o genoma de retrovírus de mamíferos, como o HIV, tem um tamanho de cerca de 9 mil nucleotídeos, e o genoma do bacte-

TABELA 24-1 Os tamanhos do DNA e das partículas virais de alguns vírus de bactérias (bacteriófagos)

Vírus	Tamanho do DNA viral (pb)	Perímetro do DNA viral (nm)	Perímetro da partícula do vírus (nm)
ϕ X174	5.386	1.939	25
T7	39.936	14.377	78
λ (lambda)	48.502	17.460	190
T4	168.889	60.800	210

Nota: os dados referentes ao tamanho dos DNA são aqueles da forma replicativa (cadeia dupla). O perímetro foi calculado supondo-se que cada par de bases ocupa um comprimento de 3,4 Å (ver Figura 8-13).

riófago ϕ X174 tem 4.220 nucleotídeos. Esses dois tipos de vírus têm genomas de RNA de cadeia simples.

Os genomas de vírus de DNA variam enormemente de tamanho (Tabela 24-1). Muitos DNA virais são circulares em pelo menos parte de seu ciclo de vida. Durante a replicação do vírus dentro de uma célula, tipos específicos de DNA viral, denominados **formas replicativas**, podem aparecer. Por exemplo, muitos DNA lineares se tornam circulares e todos os DNA de cadeia única se tornam de cadeia dupla. Um vírus de DNA típico de tamanho médio é o bacteriófago λ (lambda), o qual infecta *E. coli*. Na sua forma replicativa dentro das células, o DNA do λ é uma dupla-fita circular. Esse DNA de cadeia dupla contém 48.502 pb e em um perímetro de 17,5 μ m. O bacteriófago ϕ X174 é um vírus de DNA muito menor; o DNA na partícula viral é circular e de cadeia simples e, na forma replicativa de cadeia dupla, contém 5.386 pb. Embora os genomas virais sejam pequenos, o perímetro de seu DNA é geralmente centenas de vezes mais longo do que as dimensões da partícula viral que os contém (Tabela 24-1).

Bactérias Uma única célula de *E. coli* contém quase 100 vezes mais DNA do que a partícula do bacteriófago λ . O cromossomo de uma célula de *E. coli* é uma única molécula de DNA circular de cadeia dupla. Seus 4.641.652 pb têm um comprimento de perímetro de cerca de 1,7 mm, aproximadamente 850 vezes o comprimento de uma célula de *E. coli* (Figura 24-3). Além do enorme DNA cromossomal circular em seu nucleóide, muitas bactérias têm uma ou mais moléculas de DNA circular pequenas que estão livres no citosol. Esses elementos extracromossômicos são denominados **plasmídeos** (Figura 24-4; ver também p. 324). A maioria dos plasmídeos tem apenas alguns milhares de pares de bases de comprimento, mas alguns contêm até 400 mil pb. Eles carregam informação genética e sofrem replicação, produzindo plasmídeos-filhos, que passam para as células-filhas na divisão celular. Os plasmídeos foram encontrados em leveduras e em outros fungos, assim como nas bactérias.

Em muitos casos, os plasmídeos não conferem uma vantagem óbvia a seus hospedeiros e sua única função parece ser a autopropagação. Entretanto, alguns plasmídeos carregam genes que são úteis para a bactéria hospedeira. Por exemplo, alguns genes de plasmídeo tornam a bactéria hospedeira resistente a agentes antibacterianos. Plasmídeos

carregando o gene da enzima β -lactamase conferem resistência aos antibióticos β -lactâmicos como penicilina, ampicilina e amoxicilina (ver Figura 6-32). Estes e plasmídeos semelhantes podem passar de uma célula resistente ao antibiótico para uma célula sensível ao antibiótico da mesma ou de outra espécie de bactéria, tornando a célula receptora resistente ao antibiótico. O uso abusivo de antibióticos em algumas populações humanas serve como forte pressão seletiva, favorecendo a disseminação de plasmídeos que codificam a resistência a antibióticos (da mesma maneira que os elementos de transposição, descritos a seguir, que carregam genes similares) em bactérias patogênicas. Os médicos têm demonstrado mais relutância em prescrever antibióticos, a menos que fique bem clara a necessidade clínica. Por razões semelhantes, o uso disseminado de antibióticos em rações animais vem sendo restringido.

Eucariotos Uma célula de levedura, um dos eucariotos mais simples, tem 2,6 vezes mais DNA no genoma do que uma célula de *E. coli* (Tabela 24-2). As células de *Drosophila*, a mosca-da-fruta utilizada nos estudos genéticos clássicos, contêm mais do que 35 vezes a quantidade de DNA de uma célula de *E. coli*, e as células humanas têm 700 vezes mais. As células de muitas plantas e anfíbios contêm ainda mais. O material genético das células eucarióticas é distribuído nos cromossomos; o número diploide ($2n$) depende da espécie (Tabela 24-2). Uma célula somática humana, por exemplo, tem 46 cromossomos (Figura 24-5). Cada cromossomo de uma célula eucariótica, como os mostrados na Figura 24-5a, contém uma única, muito grande, molécula de DNA dúplice. As moléculas de DNA dos 24 diferentes tipos de cromossomos humanos (22 pares mais os cromossomos sexuais X e Y) variam de comprimento em mais de 25 vezes. Cada tipo de cromossomo dos eucariotos carrega um conjunto específico de genes.

As moléculas de DNA de um genoma humano (22 cromossomos mais o X e o Y), se enfileiradas, teriam um comprimento de cerca de um metro. A maioria das células humanas é diploide e cada célula contém, então, um total de 2 metros de DNA. Como o corpo de um homem adulto contém aproximadamente 10^{14} células, o seu DNA total tem um comprimento de 2×10^{11} km. A comparação desse dado com a circunferência da Terra (4×10^4 km) ou a distância entre a Terra e o sol ($1,5 \times 10^8$ km) ilustra o extraordinário grau de compactação do DNA em nossas células.

FIGURA 24-3 Uma célula bacteriana e seu DNA. O comprimento de um cromossomo de *E. coli* (1,7 mm) representado na forma linear em relação ao comprimento de uma célula de *E. coli* típica (2 µm).

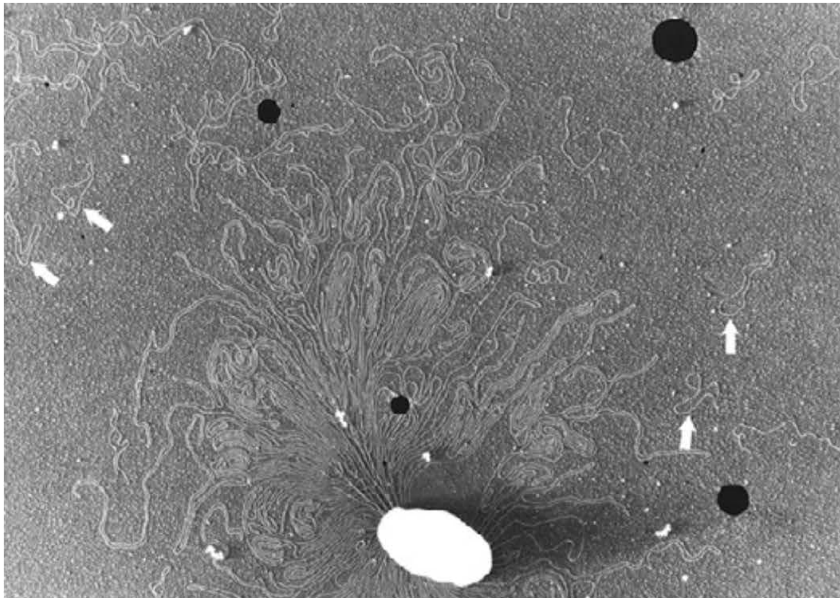
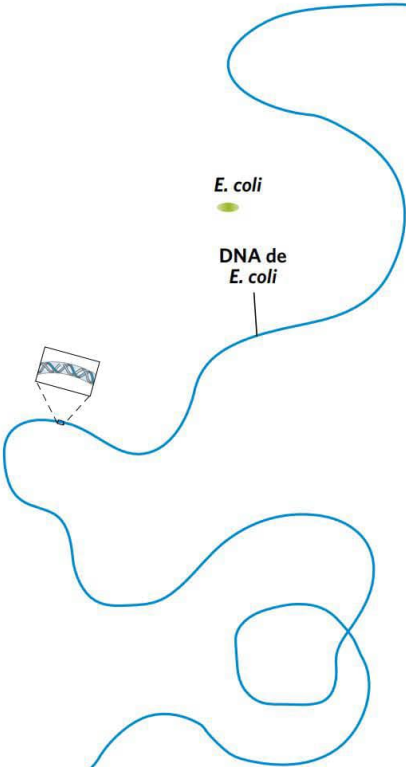


FIGURA 24-4 DNA de uma célula de *E. coli* lisada Nesta micrografia eletrônica, vários plasmídeos circulares pequenos estão indicados por setas brancas. Os pontos pretos e as manchas brancas são artefatos da preparação. [Fonte: Huntington Potter, University of Colorado School of Medicine, e David Dressler, Balliol College, Oxford University.]

TABELA 24-2 Conteúdo de DNA, de genes e de cromossomos em alguns genomas

	DNA total (pb)	Número de cromossomos ^a	Número aproximado de genes
<i>Escherichia coli</i> K12 (bactéria)	4.641.652	1	4.494 ^b
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (levedura)	12.157.105	16 ^c	6.340 ^b
<i>Caenorhabditis elegans</i> (nematódeo)	90.269.800	12 ^d	23.000
<i>Arabidopsis thaliana</i> (planta)	119.186.200	10	33.000
<i>Drosophila melanogaster</i> (mosca-da-fruta)	120.367.260	18	20.000
<i>Oryza sativa</i> (arroz)	480.000.000	24	57.000
<i>Mus musculus</i> (camundongo)	2.634.266.500	40	27.000
<i>Homo sapiens</i> (ser humano)	3.070.128.600	46	20.000

Nota: estas informações são constantemente aprimoradas. Para obter os dados mais recentes, consulte as páginas na Internet de cada projeto individual de genoma.

^aO dado corresponde ao número diploide para todos os eucariotos, exceto para a levedura.

^bInclui genes conhecidos que codificam RNA.

^cNúmero haploide de cromossomos. Linhagens selvagens de levedura geralmente têm oito (octaploide) ou mais conjuntos de cromossomos.

^dNúmero para fêmeas, com dois cromossomos X. Os machos têm um cromossomo X, mas não têm cromossomo Y, totalizando 11 cromossomos.

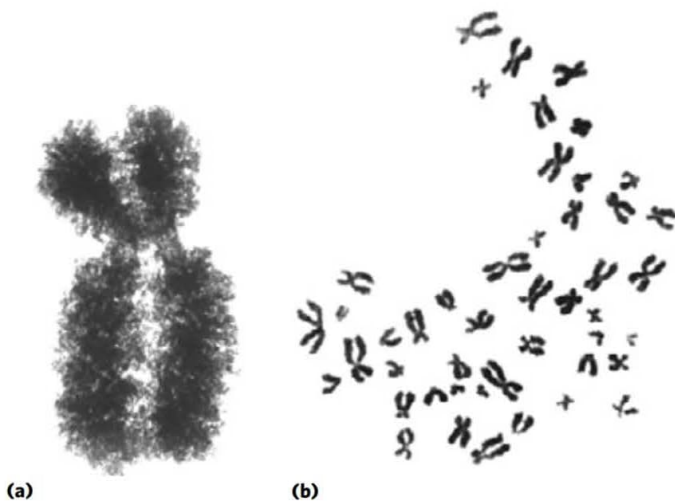


FIGURA 24-5 Cromossomos eucarióticos. (a) Um par de cromátides-irmãs ligadas e condensadas de uma célula de ovário de *hamster* chinês. Os cromossomos eucarióticos ficam neste estado após a replicação, na metáfase, durante a mitose. (b) Conjunto completo de cromossomos de um leucócito de um dos autores deste livro. Existem 46 cromossomos em cada célula somática humana normal. [Fontes: (a) Don W. Fawcett/Science Source. (b) © Michael M. Cox.]

As células eucarióticas também têm organelas, mitocôndrias (**Figura 24-6**) e cloroplastos, que contêm DNA. As moléculas de DNA mitocondrial (mtDNA) são muito menores do que os cromossomos nucleares. Nas células animais, o mtDNA contém menos do que 20 mil pb (16.569 pb no mtDNA humano) e é um dúplex circular. Em geral, cada mitocôndria tem de 2 a 10 cópias dessa molécula de mtDNA e esse número pode chegar a centenas em certas células de um embrião que esteja em processo de diferenciação celular. Em poucos organismos (p. ex., tripanossomos), cada mitocôndria contém milhares de cópias de mtDNA, organizadas em uma matriz complexa e intrincada, denominada cinetoplasto. O mtDNA de células vegetais mede de 200.000 a 2.500.000 pb. O DNA dos cloroplastos (cpDNA) também existe como dúplex circular e seu tamanho varia de 120.000 a 160.000 pb. Os DNA mitocondriais e de cloroplastos têm uma origem evolutiva nos cromossomos de bactérias primitivas que ganharam acesso ao citoplasma das células do hospedeiro e se tornaram os precursores dessas organelas (**Figura 1-40**). O DNA mitocondrial codifica os tRNA e rRNA da mitocôndria, além de poucas proteínas mitocondriais. Mais de 95% das proteínas mitocondriais são codificadas pelo DNA nuclear. As mitocôndrias e os cloroplastos se dividem quando a divisão celular ocorre. Os seus DNA são replicados antes e durante a divisão, e as moléculas-filhas de DNA passam para as organelas-filhas.

Os genes eucarióticos e os cromossomos são muito complexos

Muitas espécies de bactérias têm apenas um cromossomo por célula, e, em praticamente todos os casos, cada cromossomo contém apenas uma cópia de cada gene. Pouquíssimos



FIGURA 24-6 Mitocôndria em divisão. Alguns RNA e proteínas mitocondriais são codificados por uma das cópias do DNA mitocondrial (nenhum é visível na figura). O DNA (mtDNA) é replicado cada vez que a mitocôndria se divide, antes da divisão celular. [Fonte: D. W. Fawcett/Science Source.]

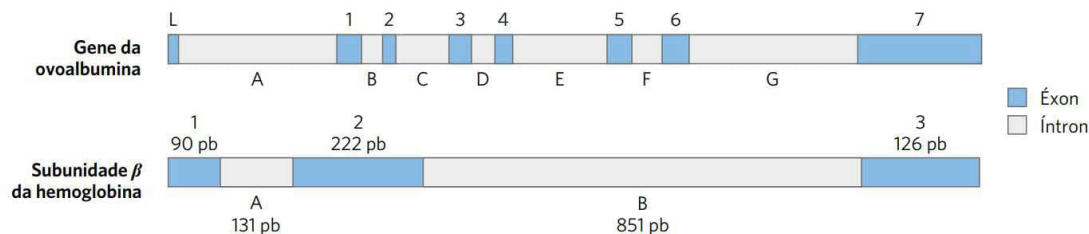


FIGURA 24-7 Íntrons em dois genes eucarióticos. O gene da ovoalbumina tem sete íntrons (de A a G), interrompendo as sequências codificantes em oito éxons (L e de 1 a 7). O gene da subunidade β da hemoglobina tem dois íntrons e três éxons, incluindo um íntron que, sozinho, contém mais da metade dos pares de bases do gene.

genes, como aqueles dos rRNA, estão repetidos várias vezes. Os genes e as sequências regulatórias perfazem quase todo o DNA nas bactérias. Além disso, quase todos os genes são precisamente colineares com as sequências de aminoácidos (ou sequências de RNA) que codificam (Figura 24-2).

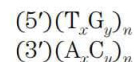
A organização dos genes no DNA de eucariotos é muito mais complexa estrutural e funcionalmente. Os estudos da estrutura de cromossomos eucarióticos e, mais recentemente, o sequenciamento de genomas inteiros de eucariotos proporcionaram muitas surpresas. Muitos, se não a maioria, dos genes de eucariotos têm uma característica estrutural distinta e enigmática: as sequências de nucleotídeos contêm um ou mais segmentos intercalados de DNA que não codificam a sequência de aminoácidos do produto polipeptídico. Esses inserts não traduzidos interrompem a relação colinear entre a sequência de nucleotídeos do gene e a sequência de aminoácidos do polipeptídeo que ele codifica. Esses segmentos de DNA não traduzidos nos genes são denominados **sequências intervenientes** ou **íntrons**, e os segmentos codificantes são denominados **éxons**. Poucos genes bacterianos contêm íntrons. Nos eucariotos superiores, um gene típico tem muito mais sequências de íntrons do que sequências de éxons. Por exemplo, no gene que codifica a única cadeia polipeptídica da ovoalbumina, uma proteína do ovo das aves (Figura 24-7), os íntrons são muito mais longos do que os éxons. Ao todo, sete íntrons perfazem 85% do DNA do gene. O gene da titina, uma proteína muscular, é o campeão de íntrons, com 178 íntrons. Os genes das histonas parecem não ter íntrons. Na maioria dos casos, a função dos íntrons não é clara. No total, apenas cerca de 1,5% do DNA humano é “codificante” ou éxons do DNA, contendo informação para produtos proteicos. Entretanto, quando os íntrons muito maiores são incluídos no cálculo, até 30% do genoma humano consiste em genes codificantes de proteínas. Uma grande quantidade de trabalho deve ser feita para compreender as outras sequências genômicas. Boa parte do DNA que não faz parte de genes está na forma de sequências repetidas de vários tipos. Estes incluem elementos de transposição (transposons), parasitas moleculares que constituem aproximadamente a metade do DNA no genoma humano (ver Figura 9-27 e Capítulos 25 e 26), e genes codificantes de moléculas de RNA funcionais de muitos tipos.

Aproximadamente 3% do genoma humano é constituído por sequências **altamente repetitivas**, também chamadas de **DNA de sequências simples**, ou **repetições de sequência simples (SSR, do inglês, simple sequence repeats)**. Essas sequências curtas, geralmente com comprimento menor do que 10 pb, às vezes são repetidas mi-

lhões de vezes em cada célula. As repetições de sequência simples também são chamadas de **DNA satélite**, uma vez que a sua composição de bases incomum geralmente as faz migrar como bandas “satélites” (separadas do restante do DNA) quando amostras de DNA celular fragmentado são centrifugadas em gradientes de densidade de cloreto de cério. Estudos sugerem que essas sequências não codificam proteínas nem RNA. A importância funcional de DNA altamente repetitivo foi definida pelo menos em alguns casos. Muito disso está associado a duas características cruciais dos cromossomos eucarióticos: centrômeros e telômeros.

O **centrômero (Figura 24-8)** é uma sequência de DNA que funciona, durante a divisão celular, como ponto de ancoragem para proteínas que fixam os cromossomos ao fuso mitótico. Essa fixação é essencial para que haja uma distribuição equitativa e ordenada do conjunto de cromossomos para as células-filhas. Os centrômeros de *Saccharomyces cerevisiae* foram isolados e estudados. As sequências essenciais para a função do centrômero têm comprimento de cerca de 130 pb e são muito ricas em pares A=T. As sequências centroméricas dos eucariotos superiores são muito mais longas e, ao contrário das leveduras, consistem geralmente em milhares de cópias em série de uma ou várias sequências de 5 a 10 pb, na mesma orientação.

Os **telômeros** (do grego, *telos*, “fim”) são sequências nos finais dos cromossomos eucarióticos que ajudam a estabilizar o cromossomo. Os telômeros terminam por múltiplas sequências repetidas na forma de



em que x e y são geralmente valores entre 1 e 4 (Tabela 24-3). O número de sequências repetidas nos telômeros, n , varia de 20 a 100 para a maioria dos eucariotos unicelulares e é geralmente maior do que 1.500 nos mamíferos. As extremidades da molécula linear de DNA não podem ser rotineiramente replicadas pela maquinaria de replicação celular (possível razão para que a molécula de DNA de bactérias

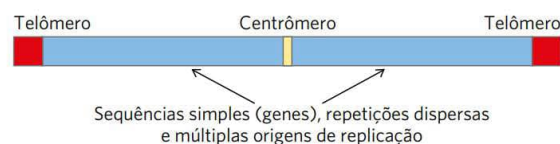


FIGURA 24-8 Elementos estruturais importantes de um cromossomo de levedura.

TABELA 24-3 Sequências teloméricas

Organismo	Sequência repetida no telômero
<i>Homo sapiens</i> (ser humano)	(TTAGGG) _n
<i>Tetrahymena thermophila</i> (protozoário ciliado)	(TTGGGG) _n
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (levedura)	((TG) ₁₋₃ (TG) ₂₋₃) _n
<i>Arabidopsis thaliana</i> (planta)	(TTTAGGG) _n

seja circular). As sequências teloméricas repetidas são adicionadas às extremidades dos cromossomos dos eucariotos principalmente pela enzima telomerase (ver Figura 26-38).

Os cromossomos artificiais (Capítulo 9) foram construídos a fim de compreender melhor a significância funcional das muitas características estruturais dos cromossomos eucarióticos. Um cromossomo artificial linear razoavelmente estável necessita de apenas três componentes: um centrômero, um telômero em cada extremidade e sequências que possibilitem o início da replicação do DNA. Foram desenvolvidos cromossomos artificiais de levedura (YAC, do inglês, *yeast artificial chromosome*; ver Figura 9-6) como ferramenta de pesquisa em biotecnologia. De maneira semelhante, estão sendo desenvolvidos cromossomos artificiais humanos (HAC, do inglês, *human artificial chromosome*) para o tratamento de doenças genéticas por terapia gênica somática. Estes podem fornecer uma nova maneira para a reposição intracelular de produtos gênicos ausentes ou defeituosos ou terapia gênica somática.

RESUMO 24.1 Elementos cromossômicos

- Os genes são segmentos de um cromossomo que contêm a informação para polipeptídeos funcionais ou moléculas de RNA. Além dos genes, os cromossomos contêm uma variedade de sequências regulatórias envolvidas na replicação, na transcrição e em outros processos.
- Moléculas de DNA genômico e de RNA geralmente têm comprimentos de várias ordens de magnitude maiores do que as partículas virais ou células que as contêm.
- Muitos genes nas células eucarióticas, mas poucos nas bactérias e nas arqueias, são interrompidos por sequências não codificantes ou íntrons. Os segmentos codificantes separados por íntrons são denominados éxons.
- Aproximadamente 1,5% do DNA genômico humano codifica para proteínas. Mesmo quando os íntrons são incluídos, menos de um terço do DNA genômico humano é constituído por genes. Grande parte do restante é constituída por sequências repetidas de vários tipos. Ácidos nucleicos parasitas, conhecidos como transposons, perfazem cerca de metade do genoma humano.
- Os cromossomos eucarióticos têm dois importantes tipos de sequências de DNA repetitivo, com funções especiais: os centrômeros, que são pontos de fixação do fuso mitótico, e os telômeros, localizados nas extremidades dos cromossomos.

24.2 DNA supertorcido

O DNA celular, como visto anteriormente, é extremamente compactado, o que implica um alto grau de organização estrutural. O mecanismo de enovelamento deve não só empacotar o DNA, mas também permitir acesso à informação nele contida. Antes de considerar como isso ocorre nos processos de replicação e transcrição, será examinada uma propriedade importante da estrutura do DNA, conhecida como **supertorção**.

“Supertorção” significa enrolar uma espiral. Um fio de telefone, por exemplo, é geralmente uma espiral. O pedaço de fio entre a base do telefone e o fone geralmente inclui uma ou mais supertorções (**Figura 24-9**). O DNA é espiralado na forma de uma dupla-hélice em que cada uma das cadeias do DNA se enrola ao redor de um eixo. O enrolamento do eixo sobre si mesmo (**Figura 24-10**) produz o DNA supertorcido. Como será detalhado a seguir, o DNA supertorcido geralmente é uma manifestação de tensão estrutural. Quando não há curvatura do eixo sobre si mesmo, diz-se que o DNA está no estado **relaxado**. O superenrolamento afeta e é afetado pela replicação e pela transcrição, sendo que ambos necessitam de separação das cadeias de DNA – um processo complicado pelo entrelaçamento das cadeias (**Figura 24-11**).

O fato de que a molécula de DNA consiga se dobrar sobre si mesma e se tornar supertorcida em um DNA celular altamente compactado pareceria lógico, e talvez trivial, não fosse um fator adicional: muitas moléculas de DNA circulares permanecem altamente supertorcidas mesmo depois de serem extraídas e purificadas, portanto, isentas de pro-

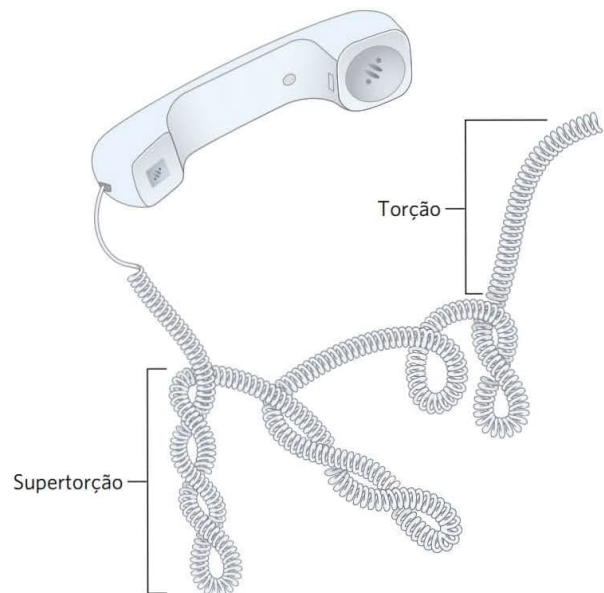


FIGURA 24-9 Supertorção. Um fio telefônico antiquado está enrolado como uma hélice de DNA, e o fio enrolado pode se enrolar em um superenrolamento. A ilustração é especialmente apropriada porque a observação de um fio de telefone ajudou Jerome Vinograd e colaboradores a ter a ideia de que muitas das propriedades de pequenos DNA circulares poderiam ser explicadas pela supertorção. A primeira detecção de DNA supertorcido por esses pesquisadores, em pequenos DNA circulares virais, ocorreu em 1965.

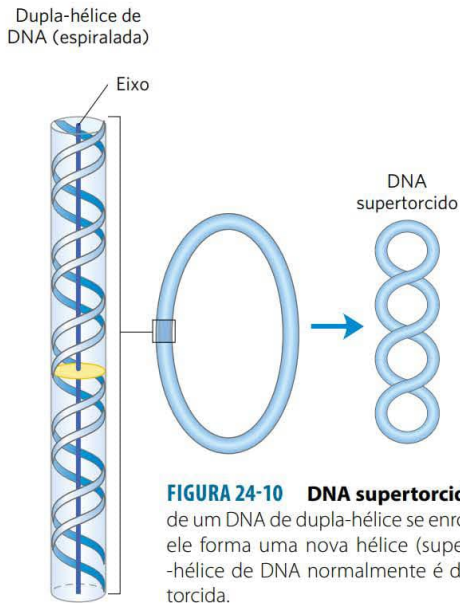


FIGURA 24-10 DNA supertorcido. Quando o eixo de um DNA de dupla-hélice se enrola sobre si mesmo, ele forma uma nova hélice (super-hélice). A super-hélice de DNA normalmente é denominada supertorcida.

teínas e de outros componentes celulares. Isso indica que a supertorção é uma propriedade intrínseca da estrutura terciária do DNA. Ela ocorre em todos os DNA celulares e é altamente regulada em cada célula.

Várias propriedades mensuráveis da supertorção do DNA foram determinadas, e o estudo da supertorção forneceu indícios para a compreensão da estrutura e da função do DNA. Esse trabalho se baseou fundamentalmente em conceitos vindos de um ramo da matemática denominado **topologia**, isto é, o estudo das propriedades de um objeto que não se modifica sob contínua deformação. Para o DNA, a deformação contínua inclui as mudanças conformacionais devidas ao movimento provocado pela energia térmica ou à interação com proteínas e outras moléculas. A deformação descontínua envolve quebra da cadeia de DNA. No caso de uma molécula de DNA circular, uma das propriedades topológicas é o fato de não ser afetada pelas deformações da cadeia de DNA, desde que não ocorram quebras na cadeia. As propriedades topológicas são alteradas apenas por quebra e religação do arcabouço de uma ou ambas as cadeias de DNA.

A seguir, serão examinadas as propriedades fundamentais e as bases físicas da supertorção.

A maior parte do DNA celular se encontra subenrolada

Para entender a supertorção, é preciso primeiro direcionar a atenção para as propriedades de DNA circulares pequenos, como os plasmídeos e os pequenos DNA virais. Quando um DNA desses não tem quebras em nenhuma de suas duas cadeias, ele é denominado **DNA circular fechado**. Se o DNA de uma molécula circular fechada apresenta uma conformação próxima da estrutura da forma B (a estrutura de Watson-Crick; ver Figura 8-13), com uma volta da dupla-hélice a cada 10,5 pb, o DNA está relaxado e não supertorcido (**Figura 24-12**). A supertorção ocorre quando o DNA é submetido a alguma forma de tensão estrutural. O DNA circular fechado, quando purificado, raramente está relaxado, independentemente da sua origem biológica. Além disso, o DNA derivado de determinado tipo de célula tem um

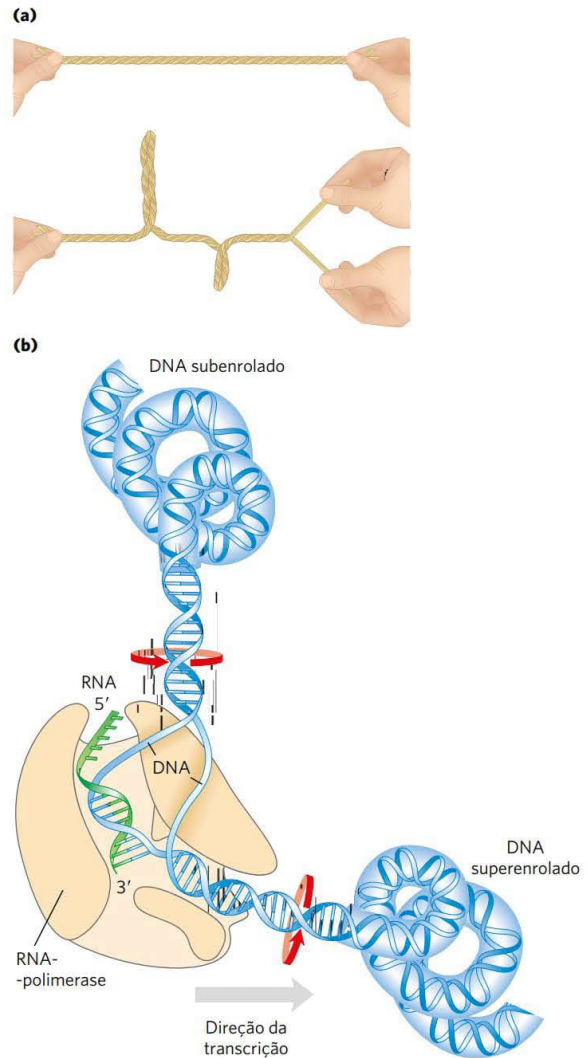


FIGURA 24-11 Os efeitos da replicação e da transcrição no DNA supertorcido. A separação das hélices leva ao estresse e à supertorção, pois o DNA está aprisionado (não está livre para girar) antes da separação das cadeias, uma vez que o DNA é uma estrutura de dupla-hélice. **(a)** O efeito geral pode ser ilustrado torcendo-se duas fitas de borracha uma sobre a outra para formar uma dupla-hélice. Se um lado é aprisionado, a separação das duas fitas na outra extremidade levará a uma torção. **(b)** Na molécula de DNA, o progresso da DNA-polimerase ou da RNA-polimerase (como mostrado aqui) ao longo do DNA envolve a separação das hélices. O resultado é que o DNA fica superenrolado na frente da enzima (a montante) e subenrolado atrás dela (a jusante). As setas vermelhas indicam a direção do enrolamento.

grau característico de supertorção. Portanto, a estrutura do DNA é tensionada de uma maneira regulada pela célula de modo a induzir supertorção.

Em praticamente todos os casos, a tensão é o resultado do **subenrolamento** da dupla-hélice de DNA circular fechado. Em outras palavras, o DNA tem um *número menor* de voltas da hélice do que o esperado para uma estrutura na forma B. Os efeitos desse subenrolamento estão resumidos na **Figura 24-13**. Um segmento de 84 pb de DNA circular no estado relaxado deve conter oito voltas da dupla-hélice,

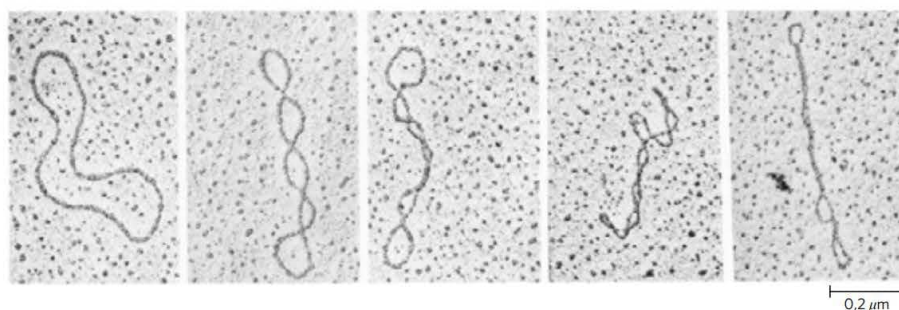


FIGURA 24-12 DNA de plasmídeos relaxados e supertorcidos. A molécula na micrografia eletrônica mais à esquerda está relaxada. O grau de supertorção aumenta da esquerda para a direita. [Fonte: Laurien Polder, de A. Kornberg, *DNA Replication*, p. 29, W. H. Freeman, New York, 1980.]

uma a cada 10,5 pb. Se uma dessas voltas é removida, serão $(84 \text{ pb})/7 = 12,0 \text{ pb}$ por volta, em vez das 10,5 encontradas no B-DNA (Figura 24-13b). Isso é um desvio da forma de DNA mais estável, e, como resultado, a molécula fica termodinamicamente tensionada. Em geral, muito dessa tensão pode ser acomodada pelo enrolamento do eixo do DNA sobre si mesmo, formando uma supertorção (Figura 24-13c; parte da tensão nesse segmento de 84 pb poderia ser simplesmente dispersada na estrutura de uma molécula grande de DNA não enrolada). Em princípio, a tensão pode também ser acomodada pelo afastamento das duas cadeias de DNA a uma distância de cerca de 10 pb (Figura 24-13d). No caso de DNA circular fechado isolado, a tensão introduzida pelo subenrolamento geralmente é acomodada pela supertorção, e não pela separação das cadeias, pois o enrolamento do eixo do DNA geralmente precisa de menos energia do que a quebra das ligações de hidrogênio que estabilizam o

pareamento de bases. Observe, entretanto, que o subenrolamento do DNA *in vivo* torna a separação das cadeias mais fácil, facilitando o acesso à informação ali contida.

Cada célula cria ativamente um subenrolamento no seu DNA com o auxílio de processos enzimáticos (descritos a seguir), e o estado tensionado resultante representa uma forma de armazenamento de energia. As células mantêm o DNA em estado subenrolado para facilitar sua compactação por torção. O subenrolamento do DNA também é importante para as enzimas do metabolismo do DNA que devem provocar a separação das cadeias como parte de sua função.

O estado subenrolado pode ser mantido somente se o DNA for um círculo fechado ou se for estabilizado por ligação a proteínas de modo que as cadeias não estejam livres para girarem uma sobre a outra. Se houver uma quebra em uma das cadeias de um DNA circular isolado e livre de proteínas, a rotação livre nesse ponto espontaneamente reverterá o subenrolamento para o estado relaxado. Em uma molécula de DNA circular fechada, entretanto, o número de voltas da hélice não pode ser alterado sem que ocorra ao menos uma quebra transitória em uma das cadeias. Assim, o número de voltas da hélice em uma molécula de DNA fornece uma descrição precisa da supertorção.

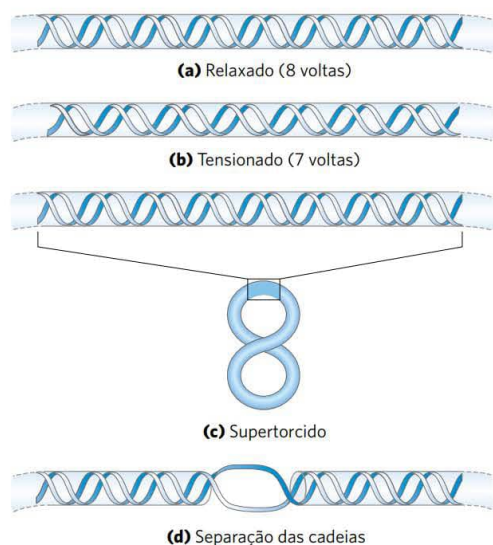


FIGURA 24-13 Efeitos do subenrolamento do DNA. (a) Segmento de DNA de molécula circular fechada com comprimento de 84 bp na forma relaxada, com oito voltas na hélice. (b) A remoção de uma volta provoca tensão na estrutura. (c) A tensão geralmente é acomodada pela formação de uma supertorção. (d) O subenrolamento do DNA também facilita a separação das cadeias. Em princípio, cada volta que é desenrolada deve facilitar a separação das cadeias por cerca de 10 pb, como mostrado na figura. Entretanto, as ligações de hidrogênio entre os pares de bases geralmente impedem a separação das cadeias de DNA em distâncias curtas como essa, e o efeito se torna importante apenas no caso de DNA mais longos e com maiores níveis de subenrolamento.

O subenrolamento do DNA é definido pelo número de ligação topológico

O campo da topologia fornece algumas ideias úteis para discutir o DNA supertorcido, particularmente o conceito de **número de ligação**. O número de ligação é uma propriedade topológica de DNA de cadeia dupla porque ele não varia quando o DNA é dobrado ou deformado, desde que ambas as cadeias de DNA permaneçam intactas. O número de ligação (Lk) está ilustrado na **Figura 24-14**.

Inicialmente, será visualizada a separação de duas cadeias de DNA circular de cadeia dupla. Se as duas cadeias estiverem associadas como está mostrado na Figura 24-14a, elas estão efetivamente unidas pelo que pode ser descrito como ligação topológica. Mesmo que todas as ligações de hidrogênio e as interações por empilhamento de bases fossem abolidas, de modo que as duas cadeias não tenham contato físico, essa ligação topológica ainda poderia manter as duas cadeias unidas. Visualize uma das cadeias circulares como o limite de uma superfície (como o filme de sabão emoldurado pelo laço de uma varinha de bolhas antes de você soprar uma bolha). O número de ligação pode ser definido como o número de vezes que a segunda cadeia atravessa essa superfície. Para a molécula na Figura 24-14a, $Lk = 1$; para aquela na Figura 24-14b, $Lk = 6$. O número de ligação de

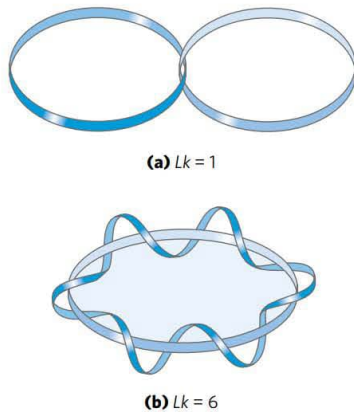


FIGURA 24-14 Número de ligação, Lk . Nesta figura, como de costume, cada linha azul representa uma cadeia de uma molécula de DNA de dupla-fita. Para a molécula (a), $Lk = 1$. Para a molécula em (b), $Lk = 6$. Uma das cadeias em (b) está representada não torcida para fins de ilustração e define os limites de uma superfície imaginária (sombreada em azul). O número de vezes que a cadeia representada enrolada passa por essa superfície fornece a definição exata de número de ligação.

um DNA circular fechado é sempre um número inteiro. Por convenção, se as conexões entre as duas cadeias de DNA estiverem arranjadas de maneira que as cadeias se enrolem em uma hélice voltada para a direita, o número de ligação é positivo (+), e se as duas cadeias se enrolarem em uma hélice voltada para a esquerda, o número de ligação é negativo (-). Números de ligação negativos, para todos os efeitos práticos, não são encontrados no DNA.

Pode-se, agora, expandir essas ideias para um DNA circular fechado com 2.100 pb (**Figura 24-15a**). Quando a molécula estiver relaxada, o número de ligação é simples-

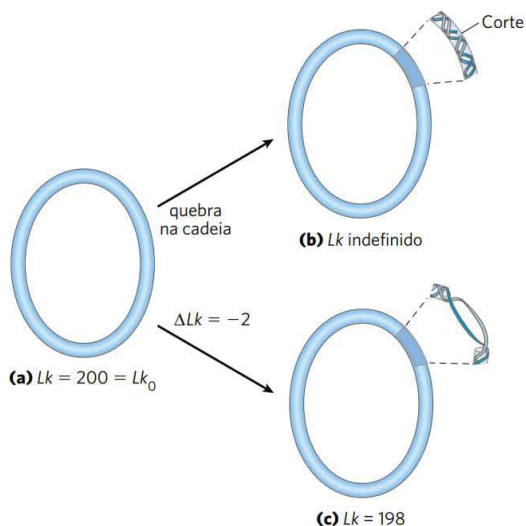


FIGURA 24-15 Número de ligação aplicado a moléculas de DNA circular fechado. Representação de um DNA circular com 2.100 pb em três formas distintas: (a) relaxado, $Lk = 200$; (b) relaxado com um corte (quebra) em uma das cadeias, Lk indefinido; e (c) subenrolado em duas voltas, $Lk = 198$. A molécula subenrolada geralmente existe como molécula supertorcida, mas o subenrolamento também facilita a separação das fitas do DNA.

mente o número de pares de bases dividido pelo número de pares de bases por volta, que é próximo de 10,5, neste caso $Lk = 200$. Para uma molécula de DNA circular ter uma propriedade topológica com esse número de ligação, ambos os filamentos devem estar intactos e sem interrupção. Se houver uma quebra em alguma das cadeias, as cadeias podem, em princípio, desenrolarem-se e separarem-se completamente. Nesse caso, não há ligação topológica e Lk é indefinido (**Figura 24-15b**).

Agora, é possível descrever o subenrolamento do DNA em termos de mudança no número de ligação. O número de ligação no DNA relaxado (Lk_0) é usado como referência. No caso da molécula mostrada na **Figura 24-15a**, $Lk_0 = 200$. Caso sejam removidas duas voltas dessa molécula, $Lk = 198$. A mudança pode ser descrita pela equação

$$\Delta Lk = Lk - Lk_0 = 198 - 200 = -2 \quad (24-1)$$

Em geral, é conveniente expressar a mudança no número de ligação em termos de uma grandeza que seja independente do comprimento da molécula de DNA. Essa quantidade, denominada **diferença de ligação específica** (σ), ou **densidade de super-hélice**, é uma medida do número de voltas removidas em relação ao número existente no DNA relaxado:

$$\sigma = \frac{\Delta Lk}{Lk_0} \quad (24-2)$$

No exemplo da **Figura 24-15c**, $\sigma = 0,01$, indicando que 1% (2 de 200) das voltas da hélice presentes no DNA (na sua forma B) foi removido. O grau de subenrolamento no DNA celular geralmente fica na faixa de 5 a 7%; isto é, $\sigma = -0,05$ a $-0,07$. O sinal negativo indica que a mudança no número de ligação é causada por um subenrolamento no DNA. A supertorção induzida por subenrolamento é, assim, definida como uma supertorção negativa. Do mesmo modo, sob certas condições, o DNA pode ser superenrolado, resultando em uma supertorção positiva. Observe que o lado para o qual o eixo da hélice de DNA gira quando o DNA está subenrolado (supertorção negativa) é a imagem especular do lado para o qual o DNA gira quando está superenrolado (supertorção

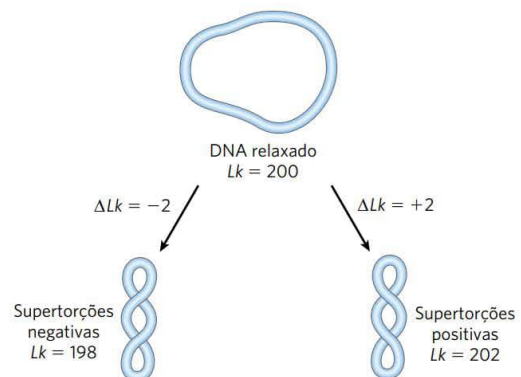


FIGURA 24-16 Supertorções negativas e positivas. No caso da molécula de DNA relaxado da **Figura 24-15a**, o subenrolamento ou superenrolamento por duas voltas da hélice ($Lk = 198$ ou 202) produzirá supertorções negativas ou positivas, respectivamente. Observe que o eixo do DNA se torce em direções opostas em cada caso.

positiva) (**Figura 24-16**). A supertorção não é um processo aleatório. A via da supertorção é descrita em grande parte pela força que a torção exerce sobre o DNA ao diminuir ou aumentar o número de ligação em relação ao B-DNA.

O número de ligação pode ser mudado por ± 1 pela quebra de uma cadeia de DNA, uma extremidade girando em 360° sobre a cadeia onde não houve quebra de ligação e ligando novamente as extremidades onde houve a quebra da cadeia. Essa mudança não tem efeito sobre o número de pares de bases ou o número de átomos da molécula de DNA circular. Duas formas de DNA circular que diferem apenas em uma propriedade topológica são denominadas **topoisômeros**.

PROBLEMA 24-1 Cálculo da densidade da super-hélice

Qual é a densidade de super-hélice (σ) de um DNA circular fechado com comprimento de 4.200 pb e um número de ligação (Lk) de 374? Qual é a densidade de super-hélice do mesmo DNA quando $Lk = 412$? Essas moléculas são negativas ou positivamente supertorcidas?

Solução: primeiro, calcule Lk_0 , dividindo o comprimento do DNA circular fechado (em pb) por 10,5 pb/volta: $(4.200 \text{ pb}) / (10,5 \text{ pb/volta}) = 400$. Pode-se, agora, calcular ΔLk da Equação 24-1: $\Delta Lk = Lk - Lk_0 = 374 - 400 = -26$. Substituindo os valores por ΔLk e Lk_0 na Equação 24-2: $\sigma = \Delta Lk / Lk_0 = -26/400 = -0,065$. Uma vez que essa densidade de super-hélice é negativa, a molécula de DNA é supertorcida negativamente.

Quando a mesma molécula de DNA tem um Lk de 412, $\Delta Lk = 412 - 400 = 12$, e $\sigma = 12/400 = 0,03$. A densidade de super-hélice é positiva, e a molécula é supertorcida positivamente.

Além de causar supertorção e provocar uma separação mais fácil das cadeias, o subenrolamento do DNA facilita alterações estruturais na molécula. Essas alterações têm menor importância fisiológica, mas ajudam a ilustrar os efeitos do subenrolamento. Lembre-se de que uma região cruciforme (ver Figura 8-19) geralmente contém poucas bases não pareadas; o subenrolamento do DNA ajuda a manter a separação de cadeias necessária (**Figura 24-17**). O subenrolamento de uma hélice de DNA voltada à direita também facilita a formação de pequenos estiramentos nas regiões de Z-DNA (voltado à esquerda) em regiões onde a sequência de bases seja compatível com a forma Z (ver Capítulo 8).

As topoisomerases catalisam mudanças no número de ligação do DNA

A supertorção do DNA é um processo regulado com precisão que influencia muitos aspectos do metabolismo do DNA. Cada célula tem enzimas cuja única função é desenrolar e/ou relaxar o DNA. As enzimas que aumentam ou diminuem o grau de subenrolamento do DNA são as **topoisomerases**, e a propriedade que elas modificam no DNA é o número de ligação. Essas enzimas desempenham um papel muito importante em processos como a replicação e a compactação do DNA. Existem duas classes de topoisomerases. As **topoiso-**

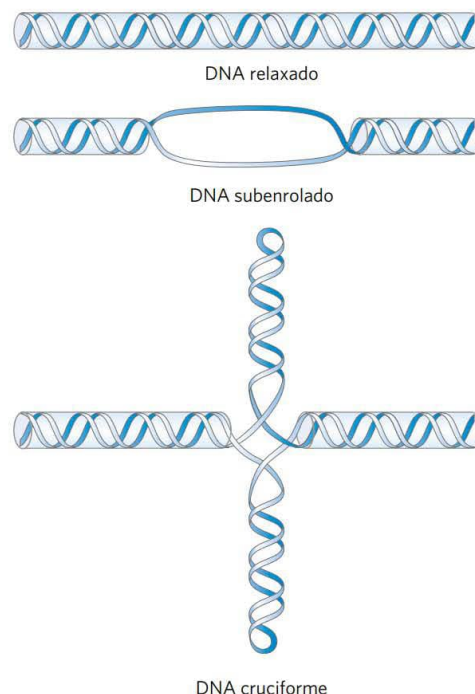


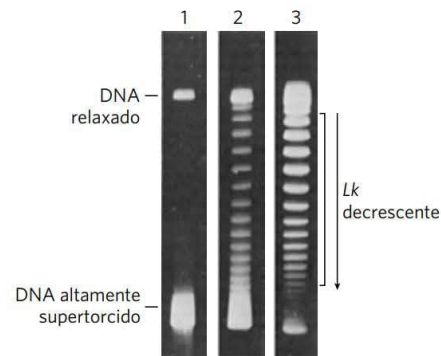
FIGURA 24-17 Favorecimento de estruturas cruciformes pelo subenrolamento do DNA. Em princípio, estruturas cruciformes podem formar-se em sequências palindrômicas (ver Figura 8-19), mas raramente ocorrem em DNA na forma relaxada, pois o DNA linear acomoda mais pares de bases em pareamento do que as estruturas cruciformes. O subenrolamento do DNA facilita a separação parcial das cadeias, necessária para propiciar a formação de estruturas cruciformes em sequências apropriadas.

merases tipo I agem quebrando transitoriamente uma das duas cadeias do DNA, passando a cadeia não rompida pela brecha e religando as extremidades quebradas. Elas modificam Lk em incrementos de 1. As **topoisomerases tipo II** quebram ambas as cadeias do DNA e modificam Lk em incrementos de 2.

Os efeitos dessas enzimas podem ser demonstrados por meio de eletroforese em géis de agarose (**Figura 24-18**). Uma população de DNA de plasmídeos idênticos com o mesmo número de ligação migra como uma banda discreta durante a eletroforese. Os topoisômeros com valores de Lk diferindo em apenas 1 podem ser separados por esse método, de modo que mudanças no número de ligação induzidas por topoisomerasas são facilmente detectáveis.

E. coli tem ao menos quatro topoisomerases diferentes (I a IV). As do tipo I (topoisomerases I e III) geralmente relaxam o DNA por remoção de supertorções negativas (aumentando Lk). A maneira pela qual as topoisomerases tipo I bacterianas mudam o número de ligação está ilustrada na **Figura 24-19**. Uma enzima bacteriana tipo II, denominada topoisomerase II ou DNA-girase, pode introduzir supertorções negativas (diminuir Lk). Para isso, ela utiliza a energia do ATP. Para alterar o número de ligação do DNA, as topoisomerases tipo II clivam as duas cadeias da molécula de DNA e passam outro dúplex pela quebra. O grau de supertorção do DNA bacteriano é mantido pela regulação da atividade das topoisomerases I e II.

FIGURA 24-18 Visualização de topoisômeros. Neste experimento, todas as moléculas de DNA apresentam o mesmo número de pares de bases, porém exibem variação no grau de supertorção. Uma vez que as moléculas de DNA supertorcidas são mais compactas do que as moléculas relaxadas, elas migram mais rapidamente durante a eletroforese em gel. Os géis aqui mostrados separam topoisômeros (movimento de cima para baixo) que variam pouco na densidade de super-hélice. Na canaleta 1, o DNA altamente supertorcido migra como banda única, mesmo que provavelmente estejam presentes vários topoisômeros. As canaletas 2 e 3 ilustram os efeitos do tratamento de DNA supertorcido com topoisomerase tipo I. O DNA da canaleta 3 foi tratado por um período maior do que o DNA da canaleta 2. Como a densidade de super-hélice do DNA fica diminuída até o ponto que corresponda à faixa na qual o gel pode separar topoisômeros individuais, aparecem bandas diferentes. Bandas individuais na região indicada pelo colchete ao lado da canaleta 3 contêm círculos de DNA com o mesmo número de ligação; Lk muda em 1 de uma banda para a outra. [Fonte: cortesia do Michael Cox Lab.]

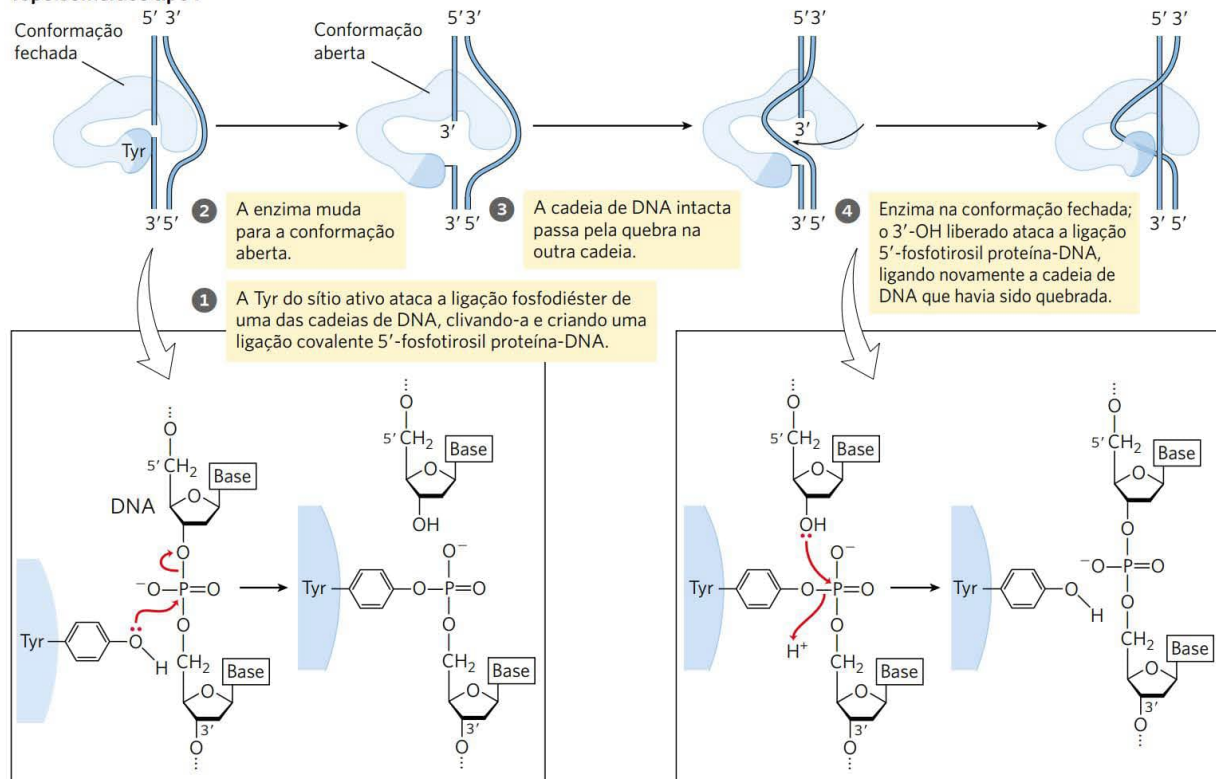


As células eucarióticas também têm topoisomerases tipos I e II. As enzimas tipo I são topoisomerases I e III. Nos vertebrados, a enzima única tipo II tem duas isoformas, denominadas $I\alpha$ e $I\beta$. A maioria das enzimas tipo II, incluindo a DNA-girase de arqueias, é aparentada, definindo a família denominada tipo IIA. As topoisomerases tipo II de eucariotos não conseguem desenrolar o DNA (introduzir supertorções negativas), mas podem relaxar tanto supertorções negativas quanto positivas (**Figura 24-20a**). A capacidade das topoisomerases tipo II de passar um segmento de DNA dúplice através de uma quebra de dupla-fita em outro dú-

plex permite que essas enzimas desvendem os **catenanos**, DNA circulares que estão topologicamente ligados (**Figura 24-20b**). Algumas topoisomerases são especializadas em funções de decatenação. Por exemplo, as bactérias têm uma enzima tipo II separada, chamada de topoisomerase IV, que está envolvida no desembarço do cromossomo durante a divisão celular (**Capítulo 25**).

As arqueias também têm uma enzima incomum, a topoisomerase VI, que, sozinha, define a família tipo IIB. A total diversidade das topoisomerases de DNA está ilustrada na Tabela 24-4.

Topoisomerase tipo I



MECANISMO-FIGURA 24-19 A reação da topoisomerase tipo I. A topoisomerase I bacteriana aumenta o Lk pela quebra de uma cadeia de DNA, passando a cadeia intacta através da quebra, e, em seguida, voltando a selar a quebra. O ataque nucleofílico pelo resíduo de Tyr do sítio ativo quebra uma cadeia de DNA. As extremidades estão ligadas por um segundo ataque nucleofílico. Em cada etapa, uma ligação de alta energia substitui a outra. [Fonte: informação de J. J. Champoux, *Annu. Rev. Biochem.* 70:369, 2001, Fig. 3.]

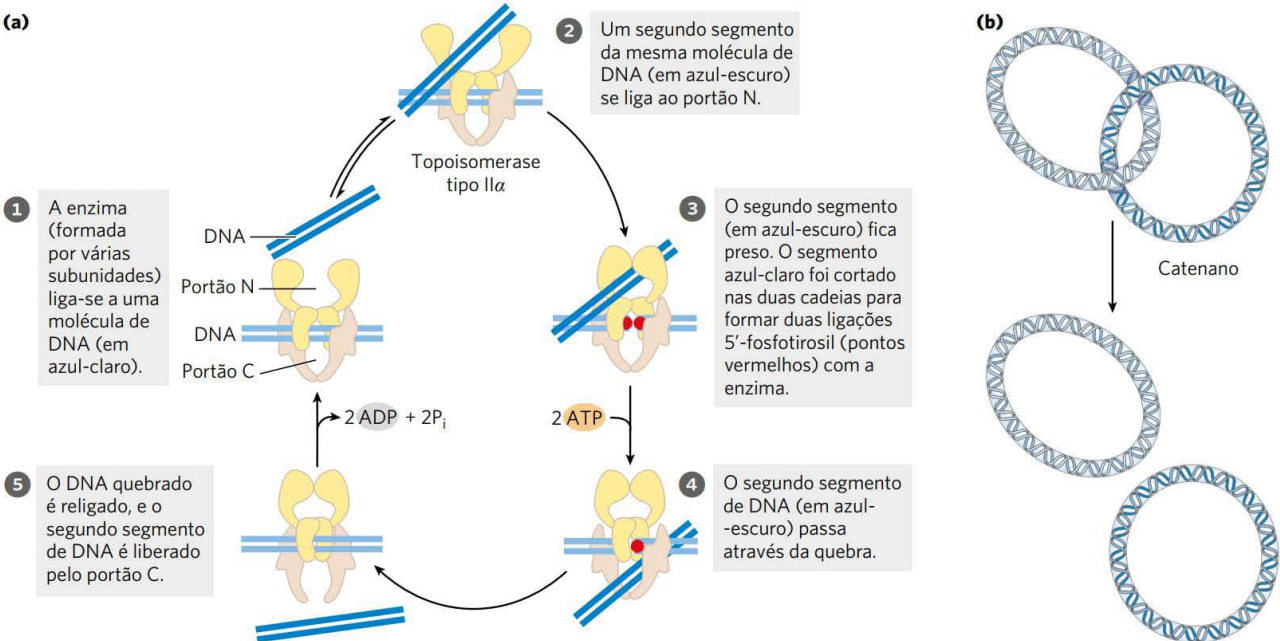


FIGURA 24-20 Alteração do número de ligação por uma topoisomerase tipo IIα eucariótica. (a) O mecanismo geral apresenta a passagem de um segmento de DNA dúplice intacto através de uma quebra transitória da cadeia dupla no outro segmento. O segmento de DNA entra e sai da topoisomerase por meio de cavidades acima e abaixo do DNA ligado, as quais são chamadas de portão N e portão C. Dois ATP são ligados e hidrolisados durante esse ciclo. A estrutura da enzima e o uso do ATP são específicos para essa reação. (b) Quando topologicamente ligadas, como mostrado, dois DNAs circulares são designados catenano. Clivando ambos os filamentos de um círculo e passando um segmento do segundo círculo através da quebra, uma topoisomerase tipo II pode decatenar os círculos. [Fonte: (a) informação de J. J. Champoux, *Annu. Rev. Biochem.* 70:369, 2001, Fig. 11.]

TABELA 24-4 Diversidade das DNA-topoisomerases

Tipo	Mecanismo	Família (definida pela classe estrutural)	Domínio(s)	Notas
IA	Passagem da cadeia ^a	Topoisomerase I	Bactérias, eucariotos	Relaxa (–)
		Topoisomerase III	Bactérias, eucariotos	Relaxa (–)
		Girase reversa	Arqueias, bactérias	Usa ATP para introduzir superenrolamentos positivos; apenas bactérias termofílicas e arqueia
IB	Rotatório ^b	Topoisomerase IB	Bactérias, eucariotos	Poucas bactérias; todos os eucariotos
IC	Rotatório	Topoisomerase V	Arqueias	Apenas <i>Methanopyrus</i>
IIA	Passagem da cadeia ^c	Topoisomerase II (DNA-girase)	Arqueias, bactérias	Introduz superenrolamento negativo (ATPase)
		Topoisomerase IIα	Eucariotos	Relaxa (+ ou –)
		Topoisomerase IIβ	Eucariotos	Relaxa (+ ou –)
		Topoisomerase IV	Bactérias	Decatenase ^d
IIB	Passagem da cadeia	Topoisomerase VI	Arqueias, bactérias, eucariotos	Apenas entre eucariotos, plantas, algas e protistas

^aVer Figura 24-19.
^bUma quebra é feita em uma cadeia e a outra cadeia pode girar para aliviar a tensão topológica.
^cVer Figura 24-20a.
^dVer Figura 24-20b.

QUADRO 24-1



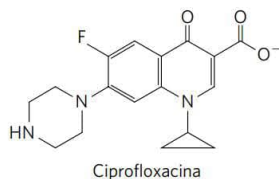
MEDICINA

Curando doenças pela inibição de topoisomerases

O estado topológico do DNA presente nas células está intimamente relacionado com sua função. Sem topoisomerases, as células não podem se replicar, compactar o seu DNA ou expressar seus genes – e morrem. Portanto, os inibidores das topoisomerases tornaram-se importantes agentes farmacêuticos, direcionados a agentes infecciosos e células tumorais.

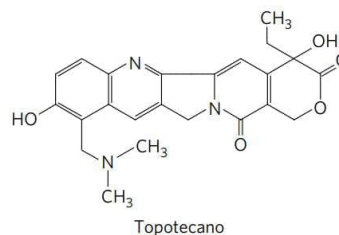
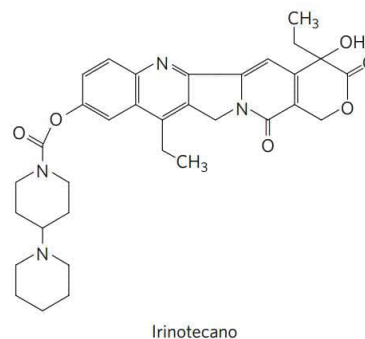
Duas classes de inibidores de topoisomerases bacterianas foram desenvolvidas como antibióticos. As cumarinas, incluindo novobiocina e cumermicina A1, são produtos naturais derivados de espécies de *Streptomyces*. Elas inibem a ligação de ATP a topoisomerases tipo II bacterianas, a DNA-girase e a topoisomerase IV. Esses antibióticos não são usados com frequência para tratar infecções em seres humanos, porém as pesquisas continuam para identificar variantes que sejam clinicamente efetivas.

Os antibióticos da quinolona, também inibidores da DNA-girase e da topoisomerase IV bacterianas, apareceram inicialmente em 1962 com a introdução do ácido nalidíxico. Esse composto tem eficiência limitada e não é mais usado clinicamente nos Estados Unidos, mas o contínuo desenvolvimento dessa classe de fármaco levou à introdução das fluoroquinolonas, exemplificadas pela ciprofloxacina (Cipro). As quinolonas agem bloqueando a última etapa da reação da topoisomerase, a resselagem da quebra na cadeia de DNA. A ciprofloxacina é um antibió-



tico de amplo espectro. Ela é um dos poucos antibióticos de efetividade confiável no tratamento de infecções por carbúnculo e é um agente de valor considerável na proteção contra um possível bioterrorismo. As quinolonas são seletivas para as topoisomerases bacterianas, inibindo as enzimas de eucariotos apenas em concentrações várias ordens de grandeza maiores do que as doses terapêuticas.

Alguns dos mais importantes agentes quimioterápicos usados no tratamento do câncer são inibidores de topoisomerases humanas. Em geral, nas células tumorais, as topoisomerases estão presentes em níveis elevados,



Como será estudado nos próximos capítulos, as topoisomerases desempenham um papel fundamental em todos os aspectos do metabolismo do DNA. Como consequência, elas são alvos importantes de fármacos no tratamento de infecções bacterianas e câncer (Quadro 24-1)

A compactação do DNA necessita de uma forma especial de supertorção

As moléculas de DNA supertorcidas são uniformes em vários aspectos. As supertorções são voltadas para a direita em uma molécula supertorcida negativamente (Figura 24-16) e tendem a ser estendidas e estreitas, em vez de compactadas, geralmente com muitas ramificações (Figura 24-21). Nas densidades de super-hélice normalmente encontradas nas células, o comprimento dos eixos supertorcidos, incluindo as ramificações, perfaz cerca de 40% do comprimento total do DNA. Esse tipo de supertorção é denominado **plectonêmica** (do grego, *plektos*, “torcido”, e *nema*, “filamento”). Esse termo pode ser aplicado a qualquer estrutura com cadeias entrelaçadas de forma simples e regular, e essa é uma boa descrição da estrutura geral do DNA supertorcido quando em solução.

A supertorção plectonêmica, a forma observada em DNA isolados no laboratório, não proporciona compactação suficiente para acomodar o DNA dentro de uma célula. Uma segunda forma de supertorção, a forma **solenóide** (Figura 24-22), pode ser adotada por um DNA subenrolado. Em vez de supertorções estendidas com orientação para a direita, características das formas plectonêmicas, a forma supertorcida solenóide envolve voltas apertadas orientadas à esquerda, de maneira semelhante a uma mangueira de jardim cuidadosamente enrolada em um carretel. Embora as suas estruturas sejam completamente diferentes, as supertorções plectonêmicas e solenóides são duas formas de supertorção negativa que podem ser mantidas pelo *mesmo* segmento de DNA subenrolado. As duas formas são facilmente interconvertíveis. Embora a forma plectonêmica seja mais estável em solução, a forma solenóide pode ser estabilizada por proteínas ligantes e é a forma encontrada nos cromossomos eucarióticos. Ela proporciona um grau muito maior de compactação (Figura 24-22). A supertorção solenóide é o mecanismo pelo qual o subenrolamento contribui para a compactação do DNA.

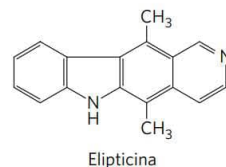
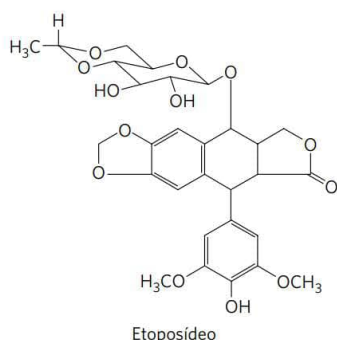
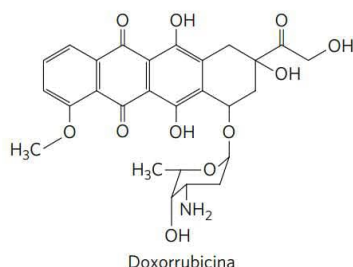
e agentes dirigidos contra essas enzimas são muito mais tóxicos aos tumores do que à maioria dos outros tipos de tecidos. Inibidores das topoisomerases tipos I e II foram desenvolvidos como medicamentos anticâncer.

A camptotecina, isolada de uma árvore ornamental chinesa e testada clinicamente pela primeira vez na década de 1970, é um inibidor das topoisomerases tipo I de eucariotos. Os ensaios clínicos indicaram eficácia limitada, apesar dos resultados promissores dos ensaios pré-clí-

cos em camundongos. Entretanto, dois derivados efetivos, o irinotecano (Campto) e o topotecano (Hycamtin), usados respectivamente para o tratamento do câncer colorretal e do câncer de ovário, foram desenvolvidos na década de 1990. É provável que nos próximos anos novos derivados sejam aprovados para uso clínico. Todos esses medicamentos agem fixando o complexo topoisomerase-DNA que clivou o DNA e inibindo a formação de nova ligação.

As topoisomerases tipo II humanas são alvos de grande número de medicamentos anticâncer, que incluem a doxorubicina (Adriamicina), etoposídeo (Etopofos) e elipticina. A doxorubicina, eficaz contra vários tipos de tumores humanos, é uma antraciclina de uso clínico. A maior parte desses medicamentos estabiliza o complexo covalente topoisomerase-DNA (clivado).

Em geral, todos esses agentes anticâncer aumentam os níveis de dano ao DNA nas células-alvo tumorais, que crescem rapidamente. Entretanto, tecidos não cancerígenos também podem ser afetados, levando a uma toxicidade generalizada e a efeitos colaterais indesejáveis que devem ser manejados durante a terapia. À medida que as terapias contra o câncer se tornam mais eficazes e as estatísticas de sobrevivência dos pacientes de câncer melhoram, o aparecimento independente de novos tumores se tornará um grande problema. Na busca contínua de novas terapias contra o câncer, as topoisomerases provavelmente permanecerão como alvo proeminente para pesquisas.



RESUMO 24.2 DNA supertorcido

- A maioria dos DNA celulares é supertorcida. O subenrolamento diminui o número total de voltas da hélice do DNA, relativamente à forma relaxada (forma B). Para manter um estado subenrolado, o DNA deve estar na forma de círculo fechado ou associado a proteínas.

O subenrolamento é medido por um parâmetro topológico denominado número de ligação, Lk .

- O subenrolamento é medido em termos de diferença de ligação específica, σ (ou densidade de super-hélice), que é $(Lk - Lk_0)/Lk_0$. Para DNA celular, σ é geralmente $-0,05$ a $-0,07$, ou seja, aproximadamente 5 a 7% das

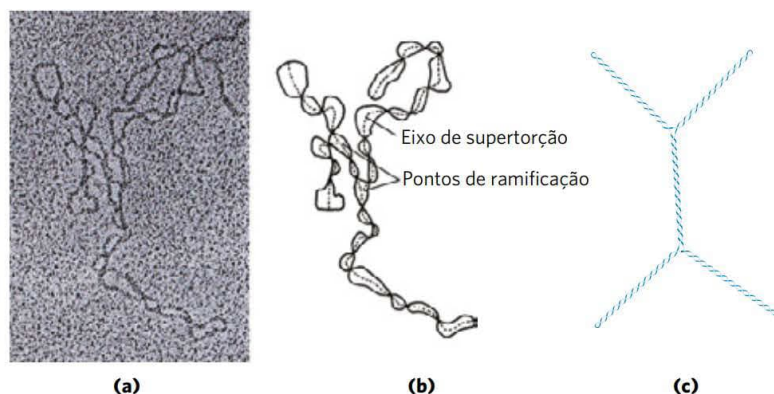


FIGURA 24-21 Supertorção plectonêmica.

(a) Micrografia eletrônica de um plasmídeo de DNA plectonemicamente supertorcido e (b) interpretação da estrutura observada. As linhas pontilhadas mostram o eixo da supertorção. Observe a ramificação da supertorção. (c) Representação idealizada dessa estrutura. [Fonte: republicada, com permissão, da Elsevier, de T. C. Boles et al. (1990) "Structure of plectonemically supercoiled DNA," *J. Mol. Biol.* 213:931–951, Fig. 2; permissão obtida por meio do Copyright Clearance Center, Inc.]

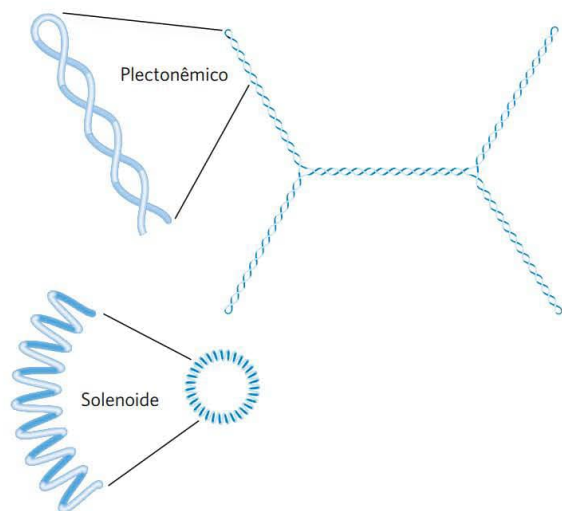


FIGURA 24-22 Super-torção plectonêmica e super-torção solenoide de da mesma molécula de DNA, desenhadas em escala. A super-torção plectonêmica toma a forma de uma espiral orientada à direita. A super-torção solenoide negativa toma a forma de voltas apertadas orientadas à esquerda ao redor de uma estrutura tubular imaginária. As duas formas são facilmente interconvertidas, embora a forma solenoide, em geral, não seja observada, a menos que certos tipos de proteínas estejam ligados ao DNA. A super-torção solenoide proporciona um grau muito maior de compactação.

voltas da hélice no DNA foram removidas. O DNA subenrolado facilita a separação das cadeias pelas enzimas do metabolismo do DNA.

- Os DNA que se diferenciam apenas pelo número de ligação são denominados topoisômeros. As topoisomerasas, enzimas que determinam subenrolamento e/ou relaxam o DNA, catalisam mudanças no número de ligação. As duas classes de topoisomerasas, tipo I e tipo II, alteram *Lk* em incrementos de 1 e 2, respectivamente, por evento catalítico.

24.3 A estrutura dos cromossomos

O termo “cromossomo” é usado para se referir a uma molécula de ácido nucleico que é o repositório da informação genética de um vírus, de uma bactéria, de uma célula eucariótica ou de uma organela. Também se refere a corpos densamente corados, observados em núcleos de células eucarióticas coradas, quando visualizadas em microscópio ótico.

A cromatina é formada por DNA e por proteínas

O ciclo de uma célula eucariótica (ver Figura 12-32) produz mudanças notáveis na estrutura dos cromossomos (**Figura 24-23**). Em células eucarióticas que não estejam se dividindo (na fase G0) e naquelas na interfase (G1, S e G2), o material cromossômico, a **cromatina**, é amorfo. Na fase S da interfase, o DNA nesse estado amorfo se replica, e cada cromossomo produz dois cromossomos-irmãos (denominados cromátides-irmãos) que permanecem associados entre si após o fim da replicação. Os cromossomos tornam-se muito

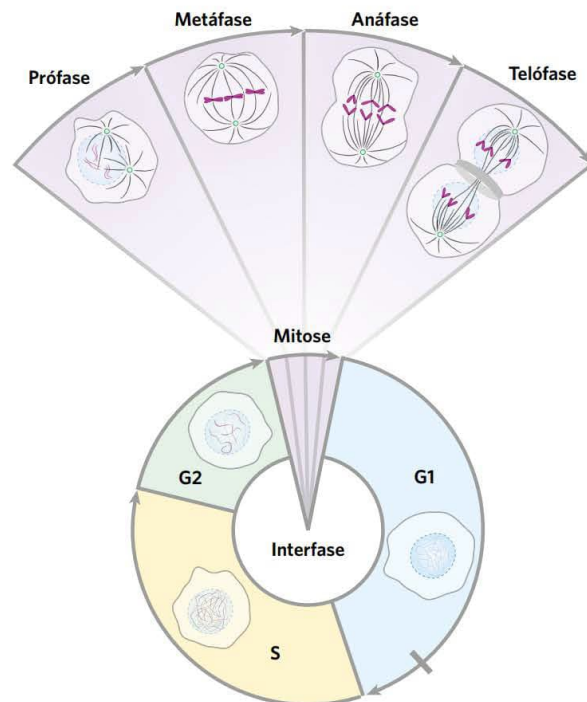


FIGURA 24-23 Alterações na estrutura dos cromossomos durante o ciclo celular eucariótico. As durações relativas das fases mostradas aqui foram escolhidas apenas por conveniência. A duração de cada fase varia com o tipo de célula e com as condições de crescimento (para organismos unicelulares) ou com o estado metabólico (para organismos multicelulares); geralmente, a mitose é a fase mais curta. O DNA celular é descondensado durante a interfase, como mostrado nos desenhos dos núcleos. O período de interfase pode ser dividido (ver Figura 12-32) em fase G1 (gap = intervalo), fase S (síntese), quando o DNA é replicado, e a fase G2, durante a qual os cromossomos replicados (cromátides) unem-se um ao outro. A mitose pode ser dividida em quatro estágios. O DNA sofre condensação na prófase. Durante a metáfase, os cromossomos condensados alinham-se em pares ao longo do plano a meio caminho entre os polos do fuso. Os dois cromossomos de cada par são ligados aos diferentes polos do fuso via microtúbulos que se estendem entre o fuso e os centrômeros. As cromátides-irmãos separam-se na anáfase, e cada uma é puxada pelo fuso ao polo ao qual se conecta. O processo é terminado na telófase. Depois da divisão celular, os cromossomos são descondensados e o ciclo começa novamente.

mais condensados durante a prófase da mitose, tomando a forma do número de pares bem definidos de cromátides-irmãos específico da espécie (**Figura 24-5**).

A cromatina é constituída por fibras contendo proteína e DNA em proporções aproximadamente iguais (em massa) e, ainda, uma pequena quantidade de RNA. O DNA na cromatina está associado muito firmemente a proteínas denominadas **histonas**, que empacotam e organizam o DNA em unidades estruturais denominadas **nucleossomos** (**Figura 24-24**). Na cromatina, também são encontradas outras proteínas além das histonas; algumas ajudam a manter a estrutura dos cromossomos e outras regulam a expressão de genes específicos (Capítulo 28). Iniciando pelos nucleossomos, o DNA cromossômico eucariótico é empacotado em sucessivas estruturas altamente organi-

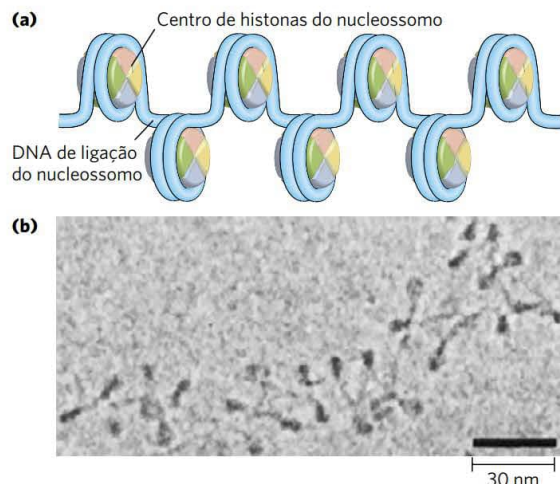


FIGURA 24-24 Nucleossomos. (a) Os nucleossomos espaçados regularmente consistem em complexos de histonas associados ao DNA. (b) Nesta micrografia eletrônica, as estruturas octaméricas de histonas envolvidas por DNA são claramente visíveis. [Fonte: (b) J. Bednar et al., Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* vol. 95 no. 24: 14173-14178, November 1998 Cell Biology Fig. 1. © 1998 National Academy of Sciences, U.S.A.]

zadas que, ao final, produzem os cromossomos altamente compactos visualizados na microscopia óptica. Agora, será apresentada a descrição dessa estrutura nos eucariotos, comparando-a com o empacotamento do DNA nas células bacterianas.

As histonas são proteínas básicas pequenas

Encontradas na cromatina de todas as células eucarióticas, as histonas têm peso molecular entre 11.000 e 21.000 e são muito ricas nos aminoácidos básicos arginina e lisina (em conjunto, esses aminoácidos perfazem um quarto do total de resíduos de aminoácidos). Todas as células eucarióticas têm cinco classes principais de histonas, que diferem no peso molecular e na composição de aminoácidos (Tabela 24-5). As histonas H3 têm sequências de aminoácidos

TABELA 24-5 Tipos e propriedades das histonas comuns

Histonas	Peso molecular	Número de resíduos de aminoácidos	Conteúdo de aminoácidos básicos (% do total)	
			Lys	Arg
H1 ^a	21.130	223	29,5	11,3
H2A ^a	13.960	129	10,9	19,3
H2B ^a	13.774	125	16,0	16,4
H3	15.273	135	19,6	13,3
H4	11.236	102	10,8	13,7

^aO tamanho dessas histonas varia um pouco de espécie para espécie. Os valores referem-se a histonas de bovino.

praticamente idênticas em todos os eucariotos, do mesmo modo que as histonas H4, o que sugere uma conservação estrita nas suas funções. Por exemplo, apenas 2 dos 102 resíduos de aminoácidos são diferentes quando comparados às moléculas da histona H4 de ervilha e de bovino, e apenas 8 resíduos diferem entre as histonas H4 de seres humanos e de leveduras. As histonas H1, H2A e H2B apresentam menor similaridade de sequência entre as espécies de eucariotos.

Cada tipo de histona está sujeito a modificações enzimáticas por metilação, acetilação, ADP-ribosilação, fosforilação, glicosilação, sumoilação ou ubiquitinação. Essas modificações afetam a carga elétrica líquida, a forma e outras propriedades das histonas, bem como as propriedades estruturais e funcionais da cromatina, participando na regulação da transcrição.

Além do mais, os eucariotos geralmente têm várias formas variantes de certas histonas, principalmente das histonas H2A e H3, descritas mais detalhadamente a seguir. As formas variantes, juntamente com suas modificações, têm papéis específicos no metabolismo do DNA.

Os nucleossomos são as unidades fundamentais da organização da cromatina

Os cromossomos dos eucariotos, esquematizados na Figura 24-5, representam a compactação de uma molécula de DNA com comprimento de cerca de $10^5 \mu\text{m}$ dentro do núcleo da célula que tem diâmetro típico de 5 a $10 \mu\text{m}$. Essa compactação envolve vários níveis de enovelamento altamente organizado. Submeter os cromossomos a tratamentos que os desenovelem parcialmente revela uma estrutura na qual o DNA está firmemente ligado a contas proteicas, geralmente espaçadas regularmente. As contas desse “colar” são complexos de DNA e histonas. Essas contas, juntamente com o DNA que as conecta, formam o nucleossomo, que é a unidade fundamental da organização da cromatina compactada de forma altamente ordenada (**Figura 24-25**). A conta de cada nucleossomo contém oito moléculas de histonas: duas cópias de H2A, duas cópias de H2B, duas cópias de H3 e duas cópias de H4. O espaçamento das contas do nucleossomo forma uma unidade que se repete geralmente a cada 200 pb, dos quais 146 pb estão firmemente ligados ao redor do centro de oito histonas e os restantes servem de DNA de ligação entre as contas do nucleossomo. A histona H1 liga-se ao DNA de ligação. O breve tratamento da cromatina com enzimas que digerem DNA leva à degradação preferencial do DNA de ligação, liberando partículas de histonas contendo 146 pb de DNA associado que foram protegidas da digestão. Pesquisadores cristalizaram centros nucleossômicos obtidos dessa maneira, e a análise por difração de raios X mostra uma partícula formada por oito moléculas de histonas com o DNA enrolado na forma de um solenoide supertorcido com orientação voltada para a esquerda (**Figura 24-25**). Estendendo-se a partir do núcleo do nucleossomo estão as caudas aminotermiais das histonas, que são intrinsecamente desordenadas (**Figura 24-26d**). A maioria das modificações nas histonas ocorre nessas caudas. Essas caudas desempenham um papel-chave na formação de contatos

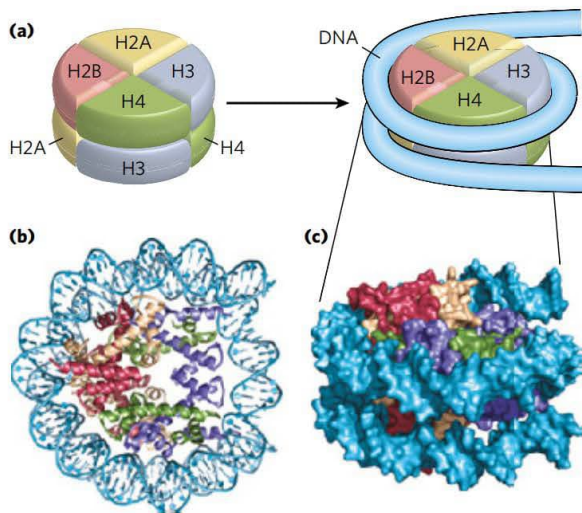
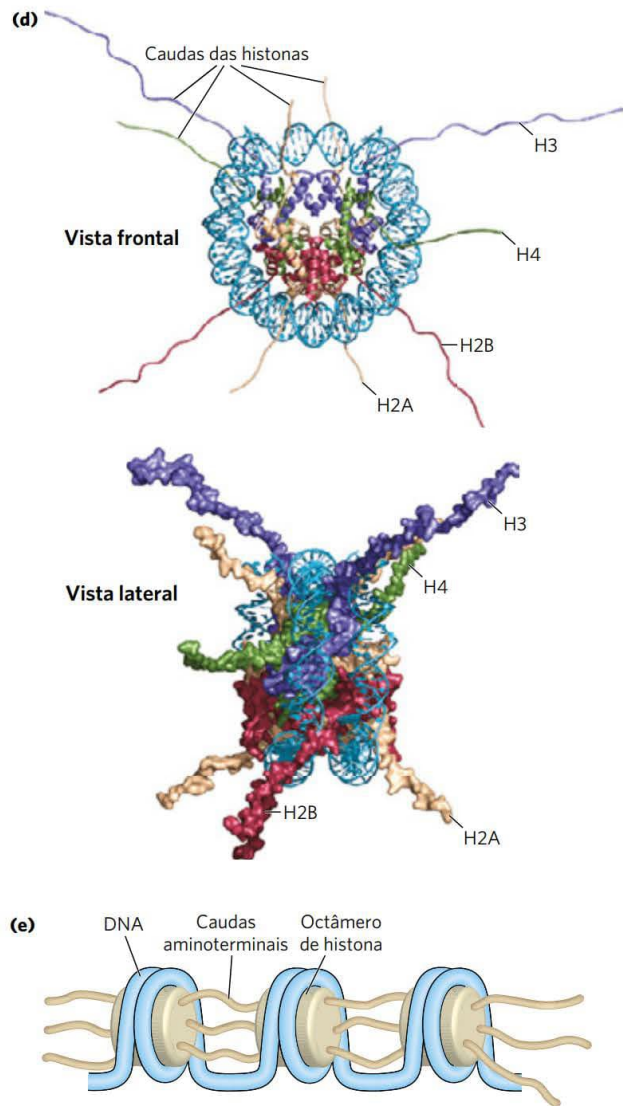


FIGURA 24-25 Enrolamento do DNA ao redor do centro de uma histona. (a) A estrutura simplificada de um octâmero do nucleossomo (à esquerda) com DNA enrolado em torno do centro da histona (à direita). (b) Uma representação de fita do nucleossomo da rã africana *Xenopus laevis*. Cores diferentes representam as diferentes histonas, correspondendo às cores em (a). (c) Representação da superfície do nucleossomo. A vista em (c) está girada em relação à vista em (b) para parear na orientação mostrada acima em (a). Um segmento de DNA de 146 pb na forma de solenoide supertorcida com orientação à esquerda enrolada em torno 1,67 vezes do complexo da histona. (d) Duas visões das caudas aminoterminais da histona saindo entre os dois DNA dúplices supertorcidos em torno do nucleossomo. Algumas caudas passam entre as supertorções através de buracos formados pelo alinhamento das cavidades menores de hélices adjacentes. As caudas de H3 e H2B surgem entre as duas espirais de DNA enroladas em torno da histona. As caudas de H4 e H2A surgem entre subunidades de histonas vizinhas. (e) As caudas aminoterminais de um nucleossomo surgem da partícula e interagem com nucleossomos vizinhos, ajudando a definir uma ordem maior de empacotamento de DNA. [Fonte: (b-d) PDB ID 1AOI, K. Luger et al., *Nature* 389:251, 1997.]



entre nucleossomos na cromatina (Figura 24-25e). Como os nucleossomos têm aproximadamente 10 a 11 nm de diâmetro, essa simples estrutura de “colar de contas” é muitas vezes chamada de fibra 10 nm.

Uma inspeção minuciosa da estrutura do nucleossomo revela por que o DNA eucariótico é subutilizado, mesmo que as células eucarióticas não possuam enzimas que estejam contra o DNA. É importante observar que o empacotamento do tipo solenoide do DNA nos nucleossomos é apenas uma das formas de supertorção que pode ocorrer pelo subenrolamento (supertorcido negativamente) do DNA. A forte associação do DNA ao redor do centro de histonas necessita que uma volta da hélice de DNA seja removida. Quando o centro proteico do nucleossomo se associa, *in vitro*, a um DNA circular relaxado, a associação introduz uma supertorção negativa. Uma vez que esse processo de associação não cliva o DNA nem muda o número de ligação, a formação de uma supertorção solenoide negativa deve ser compensada por uma

supertorção positiva na região do DNA não ligado a histonas (Figura 24-26). Como mencionado, as topoisomerases de eucariotos podem relaxar supertorções positivas. O relaxamento da região supertorcida não ligada a histonas deixa a supertorção negativa fixa (por meio da ligação ao centro de histonas do nucleossomo) e leva a uma diminuição total no número de ligação. De fato, foi provado que topoisomerases são necessárias para rearranjar cromatina, *in vitro*, a partir de histonas purificadas e DNA circular.

Outro fator que afeta a ligação do DNA às histonas no centro dos nucleossomos é a sequência desse DNA ligado. Os centros de histonas não ligam DNA aleatoriamente; ao contrário, eles tendem a se posicionar em certas localizações. Esse posicionamento não está completamente esclarecido, porém, em certos casos, parece depender de uma abundância de pares de bases A=T na hélice de DNA que fica em contato com as histonas (Figura 24-27). O agrupamento de dois ou três pares de bases A=T facilita a

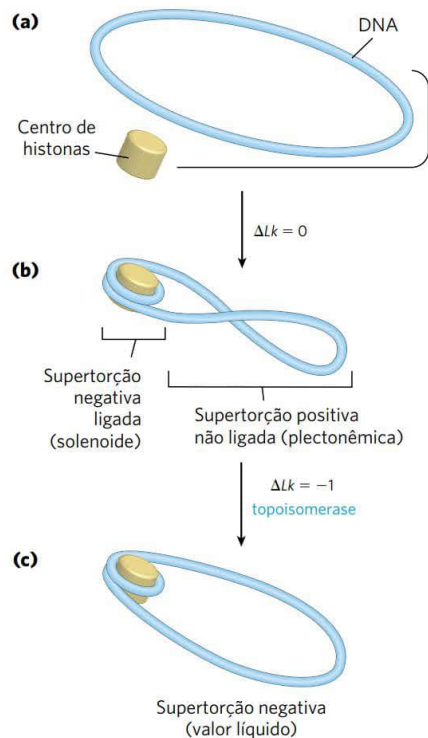


FIGURA 24-26 Montagem da cromatina. (a) DNA circular fechado relaxado. (b) A ligação ao centro de histonas, que forma o nucleossomo, induz uma super-torção negativa. Na ausência de qualquer quebra no DNA, uma super-torção positiva deve formar-se em outro lugar do DNA ($\Delta Lk = 0$). (c) O relaxamento dessa super-torção positiva pela topoisomerase deixa uma super-torção negativa líquida ($\Delta Lk = -1$).

compreensão da cavidade menor necessária para que o DNA se envolva fortemente em torno do centro de histona do nucleossomo. Os nucleossomos ligam-se perfeitamente bem a sequências onde os dinucleotídeos AA ou AT ou TT estejam arranjados alternadamente em intervalos de 10 pb, organização essa que pode corresponder, *in vivo*, a até 50% das posições ligadas a histonas.

Os núcleos de nucleossomo são colocados no DNA durante a replicação, ou seguindo outros processos que necessitam de deslocamento transitório dos nucleossomos. Outras proteínas não histonas são necessárias para o posicionamento de alguns núcleos de nucleossomos. Em vários organismos, certas proteínas se ligam a sequências específicas de DNA, facilitando a formação de nucleossomos nas proximidades. Os nucleossomos são colocados em etapas. Um tetrâmero de duas histonas H3 e duas H4 se liga primeiramente, seguido da deposição de dímeros H2A-H2B. A incorporação dos nucleossomos nos cromossomos após replicação cromossômica é mediada por um complexo de **chaperonas de histonas** que incluem proteínas conhecidas como fator de montagem da cromatina 1 (CAF1, do inglês, *chromatin assembly factor 1*), RTT106 (regulação de transposição de Ty1) e fator antissilenciador (ASF1, do inglês *anti-silencing factor 1*). Eles se ligam a variantes acetiladas de histonas H3 e H4. O mecanismo de deposição não

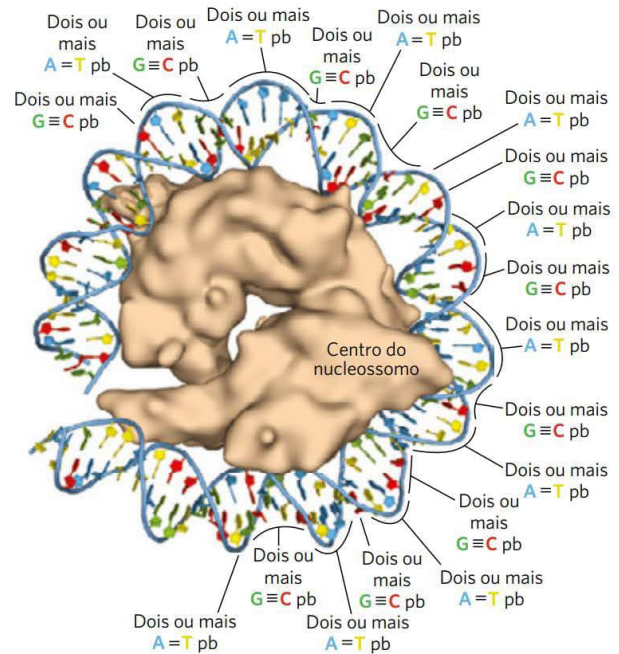


FIGURA 24-27 O efeito da sequência do DNA na ligação do nucleossomo. Períodos de dois ou mais pares de bases A=T facilitam a flexão do DNA, ao passo que períodos de dois ou mais pares de bases G=C têm o efeito oposto. Pares de bases A=T consecutivas ajudam a flexionar o DNA em um círculo, quando espaçadas por intervalos de em torno de 10 pb. Quando pares de bases G=C consecutivos estão separados por 10 pb e deslocados 5 pb de períodos de pares de bases A=T, a ligação de DNA no centro do nucleossomo é facilitada. [Fonte: PDB ID 1AOI, K. Luger et al., *Nature* 389:251, 1997.]

é conhecido em detalhes, embora se saiba que partes desse complexo interajam diretamente com partes da maquinaria de replicação. Algumas das mesmas chaperonas de histonas, ou outras, podem ajudar na montagem de nucleossomos após o reparo de DNA, transcrição ou outros processos. Em certos contextos, fatores de troca de histonas permitem a substituição de histonas variantes no centro de histonas. O posicionamento apropriado dessas variantes de histonas é importante. Estudos têm demonstrado que camundongos sem uma dessas histonas variantes morrem nas primeiras fases de embrião (Quadro 24-2). O posicionamento exato do centro dos nucleossomos também exerce um papel na expressão de certos genes eucarióticos (Capítulo 28).

Os nucleossomos são empacotados em estruturas cromossômicas altamente condensadas

O invólucro do DNA ao redor do centro do nucleossomo compacta o comprimento do DNA em cerca de sete vezes. Entretanto, a compactação final em um cromossomo é maior do que 10.000 vezes – grande evidência da existência de ordens maiores de organização estrutural. *In vitro*, longas moléculas de DNA ligadas pelos nucleossomos e histonas H1 conseguem formar uma estrutura denominada **fibra de 30 nm** (Figura 24-28a). Esse empacotamento inclui

QUADRO 24-2 MÉTODOS Epigenética, estrutura dos nucleossomos e variantes de histonas

A informação passada de uma geração a outra – para as células-filhas na divisão celular ou dos pais para sua prole –, não codificada em sequências de DNA, é denominada informação **epigenética**. A maior parte dessa informação está na forma de modificações covalentes das histonas e/ou no posicionamento de variantes de histonas nos cromossomos. A compreensão desse posicionamento no contexto de um cromossomo que abrange milhões de pares de bases é o foco de algumas tecnologias poderosas.

As regiões da cromatina onde está ocorrendo expressão ativa de genes (transcrição) tendem a ser parcialmente descondensadas e são denominadas **eucromatina**. Nessas regiões, as histonas H3 e H2A são muitas vezes substituídas pelas histonas variantes H3.3 e H2AZ, respectivamente (Figura Q-1). Os complexos que depositam nucleossomos contendo variantes de histonas no DNA são semelhantes àqueles que depositam nucleossomos com as histonas mais comuns. Os nucleossomos contendo histona H3.3 são depositados por um complexo no qual o fator de montagem da cromatina 1 (CAF1) é sub-

tituído pela proteína HIRA (um nome derivado da classe de proteínas denominada HIR, repressor de histona). Tanto CAF1 quanto HIRA podem ser considerados chaperonas de histonas por ajudarem a assegurar a montagem e o posicionamento apropriados dos nucleossomos. A histona H3.3 se diferencia da H3 quanto à sequência em apenas quatro resíduos de aminoácidos, mas esses resíduos desempenham um papel-chave na deposição das histonas.

Assim como a histona H3.3, a H2AZ está associada a um complexo diferente de deposição do nucleossomo, estando geralmente associada a regiões da cromatina envolvidas em transcrição ativa. A incorporação de H2AZ estabiliza o octâmero do nucleossomo, mas impede interações cooperativas entre os nucleossomos, necessárias para compactar o cromossomo. Isso leva a uma estrutura mais aberta do cromossomo, o que facilita a expressão de genes na região onde está localizada a histona H2AZ. O gene que codifica H2AZ é essencial nos mamíferos. Na mosca-das-frutas, a perda de H2AZ impede o desenvolvimento para além dos estágios larvais.

Outra variante da H2A é a H2AX, que está associada ao reparo do DNA e à recombinação genética. Em camundongos, a ausência de H2AX leva à instabilidade genômica e à infertilidade nos machos. Quantidades modestas de H2AX parecem estar espalhadas ao longo do genoma. Quando ocorre uma quebra de dupla-fita, moléculas de H2AX das regiões vizinhas são fosforiladas na Ser¹³⁹ na região carboxiterminal. O bloqueio experimental dessa fosforilação inibe a formação dos complexos proteicos necessários para o reparo do DNA.

A variante da histona H3 conhecida como CENPA está associada a sequências repetidas de DNA nos centrômeros. A cromatina da região dos centrômeros contém as chaperonas de histonas CAF1 e HIRA, e essas duas proteínas podem estar envolvidas na deposição dos nucleossomos contendo CENPA. A eliminação do gene da CENPA é letal em camundongos.

A função e a localização de variantes de histonas podem ser estudadas pela aplicação de tecnologias usadas em genômica. Uma técnica útil é a imunoprecipitação de cromatina (cromatina IP, ou ChIP). Os nucleossomos contendo determinada histona variante são precipitados por anticorpos que ligam especificamente essa variante. Esses nucleossomos podem ser estudados isolados do seu DNA, mas geralmente o DNA associado está incluído no estudo para determinar onde os nucleossomos de interesse se ligam. O DNA pode ser marcado e usado como sonda em um microarranjo (ver Figura 9-23), para produzir um mapa de sequências genômicas às quais se ligam esses determinados nucleossomos. Uma vez que

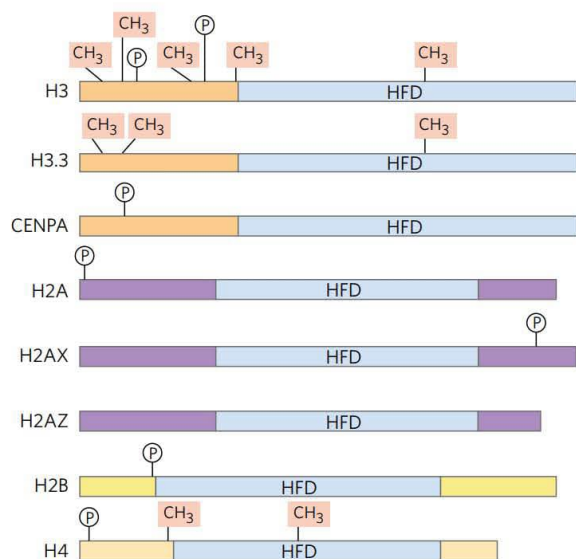


FIGURA Q-1 Diferentes variantes das histonas H3, H2A e H2B são conhecidas. Aqui estão mostradas as histonas que formam os centros de nucleossomos e algumas variantes conhecidas. Sítios de metilação de resíduos Lys/Arg e de fosforilação de Ser estão indicados. HFD indica um domínio de histona enovelado (do inglês, *histone-fold domain*), domínio estrutural comum a todas as histonas do centro do nucleossomo. As regiões indicadas em outras cores definem homólogos de sequência e estrutura. [Fonte: informação de K. Sarma e D. Reinberg, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6:139, 2005.]

uma molécula de histona H1 por centro de nucleossomo. Um modelo para a organização de histonas e DNA na fibra de 30 nm está mostrado na Figura 24-28b.

A fibra de 30 nm, amplamente estudada como um potencial segundo nível de organização da cromatina, forne-

ceria uma compactação de aproximadamente 100 vezes do DNA. No entanto, um exame minucioso da cromatina *in vivo* revelou poucas evidências de fibras de 30 nm nas células. Em vez disso, os cromossomos parecem se condensar em um estado que poderia ser descrito como um glóbulo

os microarranjos são muitas vezes denominados *chips*, essa técnica é denominada um experimento ChIP-*chip* (Figura Q-2).

Histonas variantes, juntamente com as muitas modificações que as histonas podem sofrer, ajudam a definir e isolar as funções da cromatina. Elas marcam a cromatina,

facilitando ou suprimindo funções específicas, como segregação de cromossomos, transcrição e reparo de DNA. As modificações nas histonas não desaparecem na divisão celular ou durante a meiose e, assim, são parte da informação transmitida de uma geração para outra em todos os eucariotos.

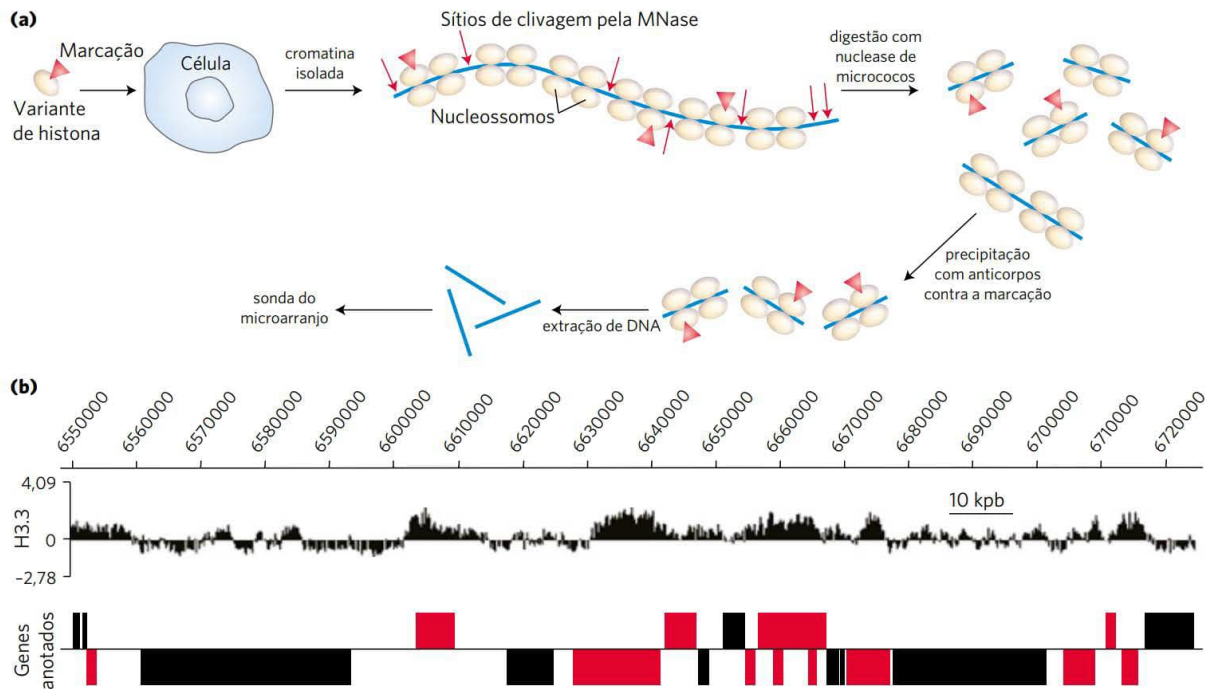


FIGURA Q-2 Um experimento ChIP-*chip* foi planejado para mostrar as sequências de DNA genômico às quais se liga uma determinada variante de histona. **(a)** Uma variante de histona contendo uma marca de epítipo (proteína ou estrutura química reconhecida por um anticorpo; ver Capítulos 5 e 9) é introduzida em um tipo de célula, onde será incorporada nos nucleossomos. (Em alguns casos, a marca do epítipo é desnecessária, uma vez que os anticorpos que se ligam diretamente na modificação da histona de interesse estão disponíveis.) A cromatina é isolada de células e digerida brevemente com nucleases de micrococcos (MNase). O DNA ligado aos nucleossomos é protegido da digestão, mas o DNA da região de ligação entre os nucleossomos é clivado, liberando segmentos de DNA ligados a um ou dois nucleossomos. O anticorpo é adicionado, e os nucleossomos contendo a variante de histona com o epítipo marcado são precipitados seletivamente. O DNA desses nucleossomos é extraído do precipitado, marcado e usado como sonda em um microarranjo que representa todas ou partes selecionadas das sequências genômicas de um dado tipo de célula. **(b)** Neste exemplo, a ligação da histona H3.3 é descrita em um segmento pequeno do cromossomo 2L da *Drosophila melanogaster*. Os números na parte superior correspondem às posições nucleotídicas numeradas no braço do cromossomo. Cada ponto no microarranjo representa 100 pb de sequência genômica, de modo que esses dados mostrados representam mais de 1.700 pontos distintos no microarranjo. Em cada local, o sinal do DNA marcado que foi precipitado com o anticorpo para a histona H3.3 está mostrado como proporção do sinal relativo ao sinal-controle produzido quando o DNA genômico total foi isolado sem imunoprecipitação, cortado, marcado com marcações de cores diferentes e usado como sonda no mesmo microarranjo. Os sinais acima da linha horizontal indicam posições genômicas onde a ligação da histona H3.3 está enriquecida em relação ao controle. Os sinais abaixo da linha são regiões onde a histona H3.3 está relativamente ausente. Os genes anotados (conhecidos) nesse segmento do genoma estão mostrados na parte inferior do painel de (b), como barras grossas. As barras acima da linha são genes transcritos no sentido 5' para 3' da esquerda para a direita, e os quadros abaixo da linha são aqueles transcritos da direita para a esquerda. As barras vermelhas são genes onde a RNA-polimerase II também é abundante, o que indica transcrição ativa. A ligação da histona H3.3 se concentra nos genes e perto deles, sofrendo transcrição ativa. [Fonte: dados por cortesia de Steve Henikoff. Reimpressa, com permissão, de Y. Mito et al., *Nature Genet.* 37:1090, 2005.]

amassado (Figura 24-28c). As fibras de 10 nm condensam-se, enovelando-se sobre si mesmas. A condensação não é tão organizada quanto uma fibra de 30 nm, mas também não é aleatória. Um cromossomo humano médio de 135 milhões de pares de bases é potencialmente longo o suficien-

te para abranger um núcleo de 10 μm mais de 5.000 vezes. Assim, em princípio, os cromossomos poderiam se dobrar, de modo que os segmentos de DNA, situados a milhões de pares de bases, pudessem estar localizados adjacentes uns aos outros. No entanto, o enovelamento geralmente ocor-

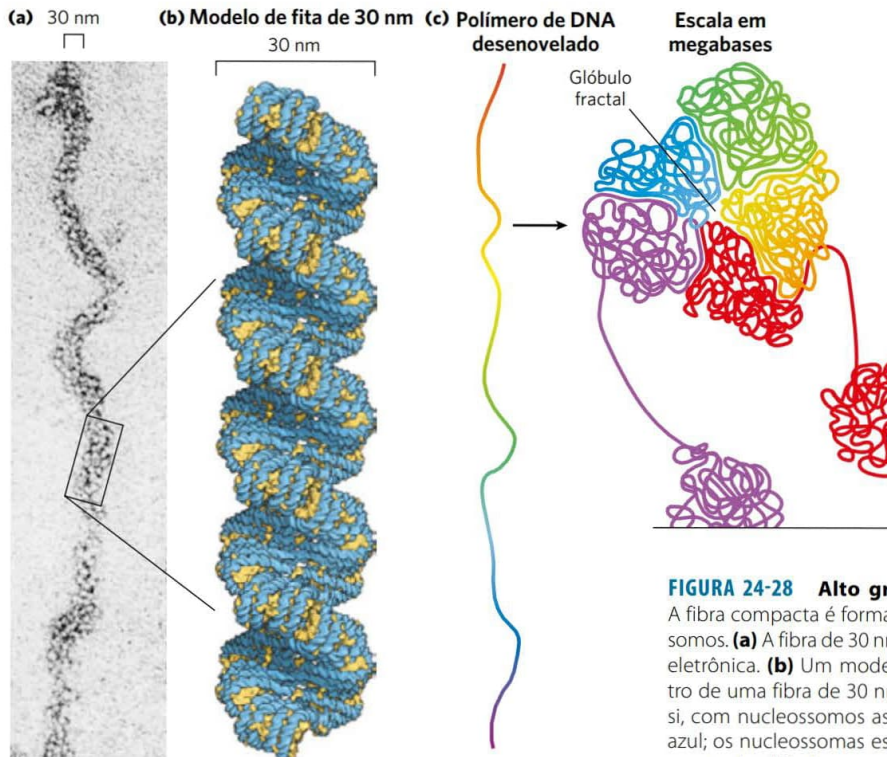


FIGURA 24-28 Alto grau de organização dos nucleossomos.

A fibra compacta é formada pelo empacotamento firme dos nucleossomos. **(a)** A fibra de 30 nm, como pode ser visualizada por microscopia eletrônica. **(b)** Um modelo para organização de nucleossomos dentro de uma fibra de 30 nm. Duas fibras de 10 nm são enroladas entre si, com nucleossomos associados a cada uma delas. O DNA está em azul; os nucleossomos estão em amarelo. **(c)** Um arranjo de enovelamento de glóbulo amassado de fibras de 10 nm em um cromossomo condensado. O enovelamento parece ser aleatório, mas segmentos cromossômicos próximos permanecem associados e o enovelamento ocorre para minimizar a formação de nós. [Fontes: (a) Barbara Hamkalo, University of California, Irvine, Department of Molecular Biology and Biochemistry. (b) Modelo criado a partir de informações de F. Song et al., *Science* 344:376, 2014, Fig. 1C.]

re, de modo que a distância linear entre segmentos de DNA é refletida em sua distância espacial na estrutura dobrada. O enovelamento também ocorre para evitar a formação de nós. A atividade transcricional pode diminuir o nível de condensação, produzindo regiões relativamente abertas. Regiões transcricionalmente inativas e regiões sem genes são altamente condensadas em uma forma denominada **heterocromatina**.

Os níveis mais altos de enovelamento ainda não estão compreendidos; contudo, parece que certas regiões do DNA se associam com um andaime cromossômico (**Figura 24-29**). As regiões associadas com esse andaime são separadas por alças de DNA com talvez 20 a 100 kpb. O DNA em uma alça contém um conjunto de genes relacionados entre

si. O andaime pode conter várias proteínas, sobretudo topoisomerase II e proteínas SMC, descritas acima. A presença da topoisomerase I enfatiza ainda mais a relação entre o DNA subenrolado e a estrutura da cromatina. A topoisomerase II é tão importante para a manutenção da estrutura da cromatina que inibidores dessa enzima podem matar rapidamente células que estejam se dividindo. Vários fármacos usados na quimioterapia do câncer são inibidores da

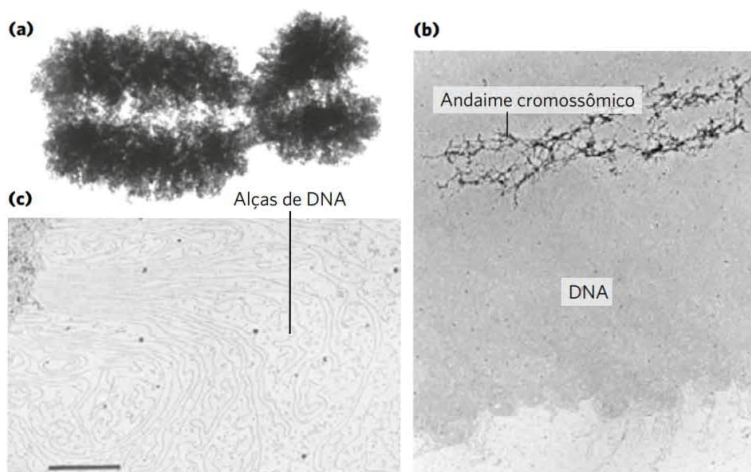


FIGURA 24-29 As alças de DNA ligadas ao andaime cromossômico.

(a) Um cromossomo inchado, produzido em tampão com baixa força iônica, como pode ser visualizado na microscopia eletrônica. Observe o aparecimento de alças de cromatina nas margens. **(b)** A extração das histonas deixa um andaime cromossômico proteico cercado por DNA aberto. **(c)** O DNA aparece organizado em alças ligadas em sua base ao andaime, no canto superior esquerdo; escala = 1 μm. As três imagens estão em diferentes aumentos. [Fontes: (a, b) Don W. Fawcett/Science Source. (c) U. K. Laemmli et al., "Metaphase chromosome structure: The role of nonhistone proteins," *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 42:351, 1978. © Cold Spring Harbor Laboratory Press.]

topoisomerase II, os quais permitem que a enzima promova a quebra da cadeia, mas não permitem a formação de novas ligações no ponto das quebras (ver Quadro 24-1).

Existem níveis adicionais de organização no núcleo eucariótico. Logo antes da divisão celular durante a mitose, os cromossomos podem ser vistos como estruturas altamente condensadas e organizadas (**Figura 24-30a**). Durante a interfase, os cromossomos aparecem dispersos (**Figura 24-30b**, parte superior), mas eles não serpenteiam aleatoriamente no espaço nuclear (**Figura 24-30b**, parte inferior). Cada cromossomo é limitado dentro de um domí-

nio subnuclear, denominado **território cromossômico** (**Figura 24-30c**). A localização exata dos territórios cromossômicos varia de célula para célula em um organismo, mas alguns padrões espaciais são evidentes. Alguns cromossomos têm uma densidade de genes mais alta do que outros (p. ex., os cromossomos humanos 1, 16, 17, 19 e 22), e estes tendem a ter territórios no centro do núcleo. Os cromossomos com mais heterocromatina tendem a estar localizados na periferia nuclear. Espaços entre cromossomos são frequentemente locais onde máquinas transcricionais e genes transcricionalmente ativos em cromossomos vizinhos estão concentrados.

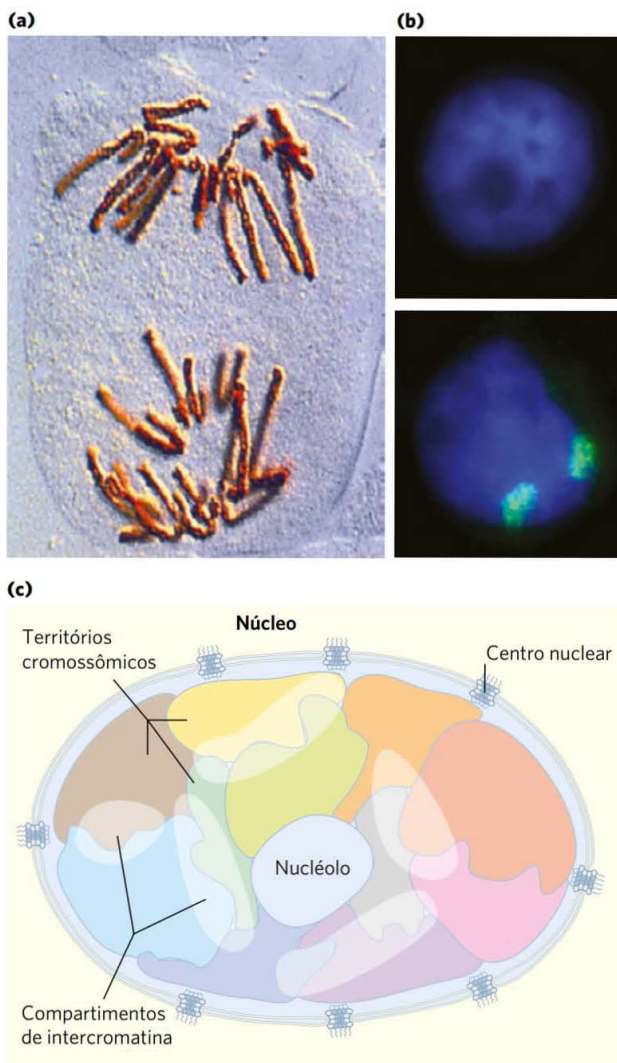


FIGURA 24-30 Organização cromossômica no núcleo eucariótico.

(a) Cromossomos condensados na anáfase mitótica em células da campainha (*Endymion* sp.). (b) Núcleos da interfase de células epiteliais da mama humana. O núcleo no fundo foi tratado de forma que suas duas cópias do cromossomo 11 fiquem verdes. (c) Desenho mostrando territórios cromossômicos em um núcleo eucariótico. Os compartimentos de intercromatina são enriquecidos na maquinaria transcricional e apresentam muitos genes transcritos ativamente. O nucléolo é uma suborganização dentro do núcleo, onde os ribossomos são sintetizados e montados (Capítulo 27). [Fontes: (a) Pr. G. Giménez-Martín/Science Source. (b) Karen Meaburn e Tom Misteli/National Cancer Institute.]

As estruturas condensadas dos cromossomos são mantidas pelas proteínas SMC

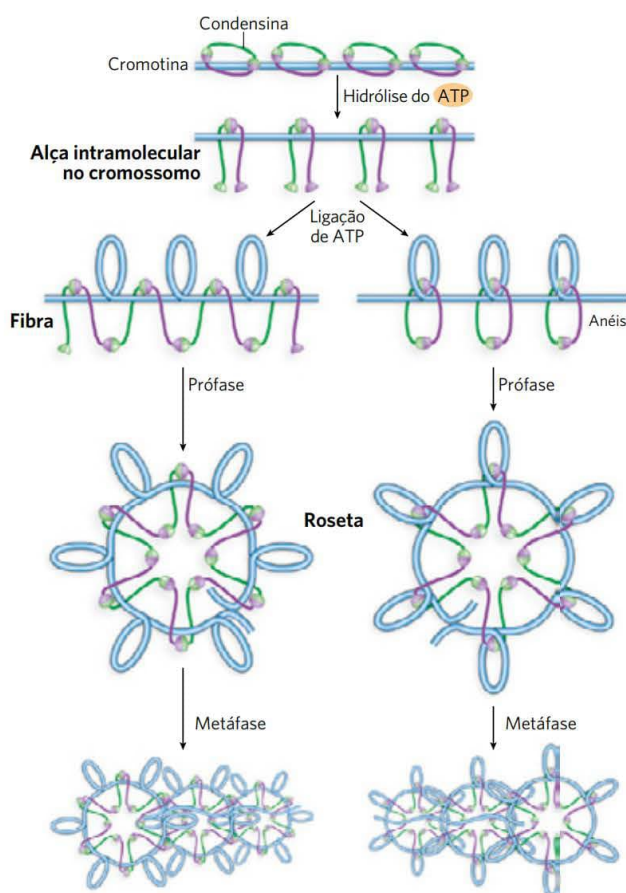
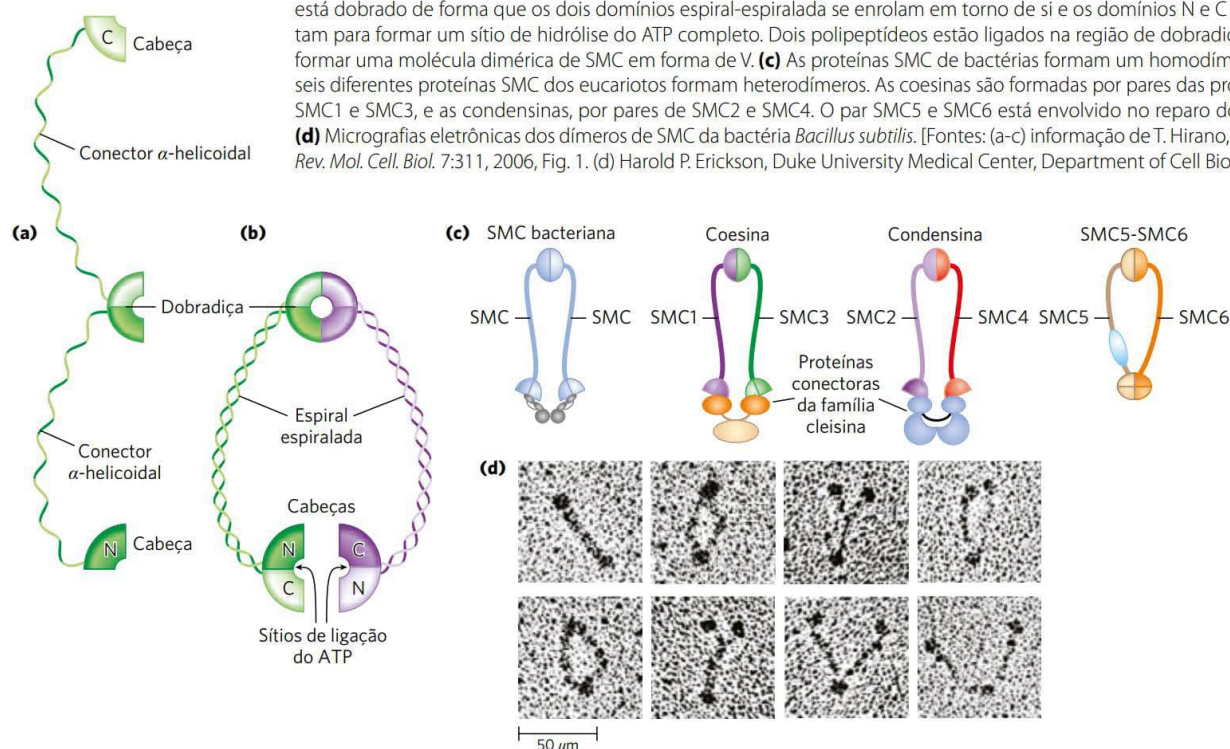
Uma terceira classe importante de proteínas da cromatina, além das histonas e das topoisomerasas, são as **proteínas SMC** (do inglês, *structural maintenance of chromosomes*). A estrutura primária das proteínas SMC é formada por cinco domínios distintos (**Figura 24-31a**). Os domínios globulares amino e carboxiterminal, N e C, que têm, cada um, parte de um sítio de hidrólise de ATP, estão conectados por duas regiões de α -hélice como motivo espiral-espiralada (ver Figura 4-11) unido por um domínio de dobradiça. Essas proteínas geralmente são diméricas, formando um complexo em forma de V, que se sabe estar ligado por meio dos domínios de dobradiça (**Figura 24-31b**). Um domínio N e um domínio C se juntam para formar um sítio de hidrólise do ATP completo em cada uma das extremidades do V.

As proteínas da família das SMC são encontradas em todos os tipos de organismo, das bactérias aos seres humanos. Os eucariotos têm dois tipos principais, as coesinas e as condensinas, e ambas estão ligadas a proteínas regulatórias e acessórias (**Figura 24-31c**). As **coesinas** desempenham um papel substancial na manutenção da união das cromátides-irmãs imediatamente após a replicação e quando os cromossomos se condensam para a metáfase. Essa associação é essencial para que os cromossomos sejam adequadamente segregados na divisão celular. As coesinas, juntamente com uma terceira proteína, a cleisina, formam um anel ao redor dos cromossomos replicados, que os une até que a separação seja necessária. O anel pode expandir-se e contrair em resposta à hidrólise de ATP. As **condensinas** são essenciais para a condensação dos cromossomos quando as células entram em mitose. Em condições laboratoriais, as condensinas ligam-se ao DNA de maneira a criar supertorções positivas, isto é, a ligação de condensinas torna o DNA superenrolado, ao contrário daquele com o subenrolamento induzido pela ligação dos nucleossomos. Um modelo para o papel das condensinas na compactação da cromatina está mostrado na **Figura 24-32**. As coesinas e as condensinas são essenciais na orquestração das muitas mudanças que ocorrem na estrutura dos cromossomos durante o ciclo celular das células eucarióticas (**Figura 24-33**).

O DNA das bactérias também é altamente organizado

Será considerada agora, brevemente, a estrutura dos cromossomos bacterianos. O DNA bacteriano é compactado em uma estrutura denominada **nucleoide**, que pode ocu-

FIGURA 24-31 Estrutura das proteínas SMC. (a) As proteínas SMC têm cinco domínios. (b) Cada polipeptídeo SMC está dobrado de forma que os dois domínios espiral-espiralada se enrolem em torno de si e os domínios N e C se juntam para formar um sítio de hidrólise do ATP completo. Dois polipeptídeos estão ligados na região de dobradiça para formar uma molécula dimérica de SMC em forma de V. (c) As proteínas SMC de bactérias formam um homodímero. As seis diferentes proteínas SMC dos eucariotos formam heterodímeros. As coesinas são formadas por pares das proteínas SMC1 e SMC3, e as condensinas, por pares de SMC2 e SMC4. O par SMC5 e SMC6 está envolvido no reparo do DNA. (d) Micrografias eletrônicas dos dímeros de SMC da bactéria *Bacillus subtilis*. [Fontes: (a-c) informação de T. Hirano, *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* 7:311, 2006, Fig. 1. (d) Harold P. Erickson, Duke University Medical Center, Department of Cell Biology.]



par uma parte significativa do volume celular (**Figura 24-34**). O DNA parece estar ancorado em um ou mais pontos da face interna da membrana plasmática. Conhece-se muito menos sobre a estrutura do nucleóide do que sobre a cromatina dos eucariotos, entretanto, essa estrutura complexa vai aos poucos sendo revelada. Em *E. coli*, algo como um arcabouço parece organizar o cromossomo *circular* em uma série de cerca de 500 domínios em alças, cada um com uma média de 10.000 pb (**Figura 24-35**), como descrito para a cromatina. Esses domínios são topologicamente restritos; por exemplo, se o DNA for clivado em um domínio, apenas esse domínio será relaxado. Os domínios não têm finais fixos. Ao contrário, os limites estão provavelmente em constante movimentação ao longo do DNA, coordenados com a sua replicação. O DNA bacteriano não parece ter qualquer estrutura que possa se comparar com a organização proporcionada pelos nucleossomos nos eucariotos. Proteínas semelhantes a histonas são abundantes em *E. coli*, e o exemplo mais bem caracterizado é uma proteína de duas subunidades, denominada HU (M_r 19.000); no entanto, essas proteínas se ligam e se dissociam em mi-

FIGURA 24-32 O possível papel das condensinas na condensação da cromatina. Inicialmente, o DNA é ligado à região de dobradiça da proteína SMC, no interior do que se torna um anel SMC intramolecular. A ligação de ATP leva a uma associação cabeça com cabeça, formando alças superespiraladas no DNA ligado. Rearranjos subsequentes das interações cabeça com cabeça para formar rosetas condensam o DNA. As condensinas podem organizar essas alças dos segmentos dos cromossomos de várias maneiras. Dois modelos atuais estão mostrados [Fonte: informação de T. Hirano, *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* 7:311, 2006, Fig. 6.]

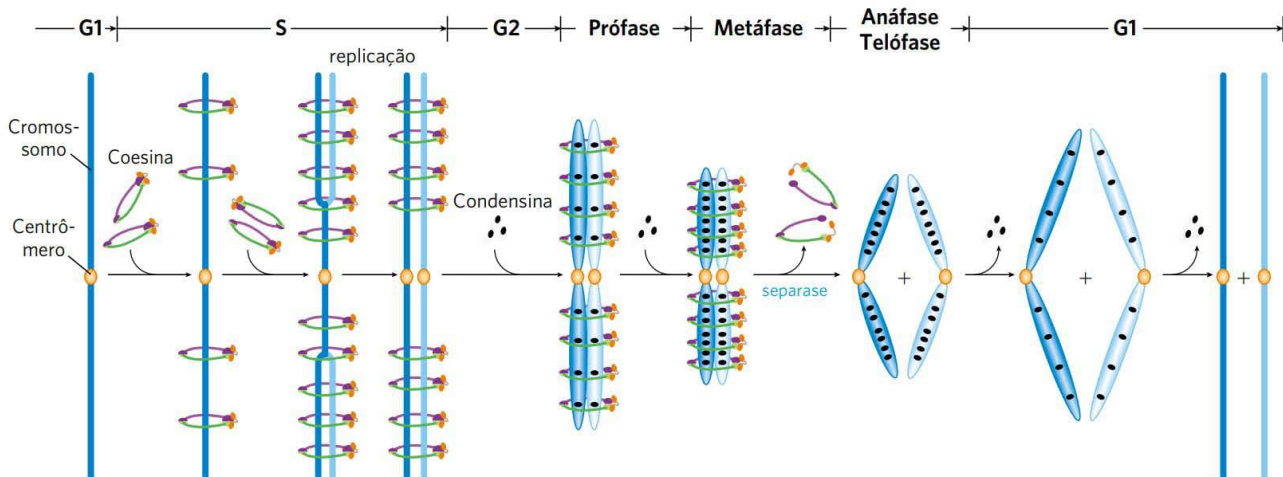


FIGURA 24-33 Os papéis das coesinas e das condensinas no ciclo celular eucariótico. As coesinas são depositadas sobre os cromossomos durante a fase G1 (ver Figura 24-23), unindo as cromátides-irmãs durante a replicação. Com o início da mitose, as condensinas ligam-se e mantêm as cromátides em um estado condensado. Durante a anáfase, uma atividade denominada separase remove as ligações de coesina. Uma vez que as cromátides se separam, a separação das condensinas inicia, e os cromossomos retornam ao estado não condensado. [Fonte: informação de D. P. Bazett-Jones et al., *Mol. Cell* 9:1183, 2002, Fig. 5.]

nutos, e nunca foi observada uma estrutura regular DNA-histona estável. As mudanças estruturais dinâmicas do cromossomo bacteriano podem refletir uma necessidade de acesso mais fácil à informação genética. O ciclo de divisão celular bacteriana pode ser tão curto como 15 minutos, ao passo que uma célula eucariótica típica pode não se dividir em horas ou mesmo em meses. Além disso, uma proporção muito maior do DNA bacteriano é usada para codificar RNA e/ou produtos proteicos. Taxas mais altas de metabolismo celular nas bactérias significam que, em relação à maior parte das células eucarióticas, uma maior proporção do DNA está sendo transcrita ou replicada em dado momento.

Após essa visão geral da complexidade da estrutura do DNA, será apresentada, no próximo capítulo, uma discussão acerca do metabolismo do DNA.



FIGURA 24-34 Nucleóide de *E. coli*. O DNA dessas células está corado com um corante que emite fluorescência quando exposto à luz ultravioleta. As áreas claras definem o nucleóide. Observe que algumas células replicaram seu DNA, mas ainda não sofreram divisão celular e, portanto, apresentam muitos nucléolos.

RESUMO 24.3 A estrutura dos cromossomos

- A unidade fundamental de organização na cromatina das células eucarióticas é o nucleossomo, que consiste em histonas e um segmento de DNA de 200 pb. O centro é uma partícula proteica contendo oito histonas (duas cópias de cada uma das histonas H2A, H2B, H3 e H4) circundada por um segmento de DNA (cerca de 146 pb) na forma de supertorção solenoide orientada para a esquerda.
- Os nucleossomos podem ser organizados em fibras de 30 nm *in vitro*, mas essa estrutura não foi encontrada nas células. O enovelamento de alto grau de organização dos cromossomos envolve a fixação a um suporte

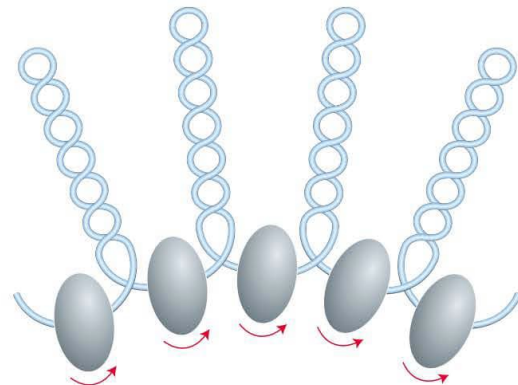


FIGURA 24-35 Domínios em alça do cromossomo de *E. coli*. Cada domínio tem um comprimento de cerca de 10.000 pb. Os domínios não são estáticos, mas se movem ao longo do DNA à medida que a replicação continua. Barreiras nos limites dos domínios, de composição desconhecida, evitam o relaxamento do DNA para além dos limites do domínio onde tenha ocorrido uma quebra. Os supostos complexos limitrofes estão mostrados na forma de estruturas ovais em sombreado acinzentado. As setas indicam o movimento do DNA através dos limites dos complexos.

cromossômico. Cromossomos individuais são mantidos dentro de subdomínios nucleares, chamados de territórios. As proteínas histona H1, topoisomerase II e SMC desempenham papéis organizacionais nos cromossomos. As proteínas SMC, principalmente as coesinas e as condensinas, desempenham papéis importantes na manutenção da organização dos cromossomos durante cada um dos estágios do ciclo celular.

- O cromossomo bacteriano encontra-se intensamente compactado em um nucleóide, mas parece ser muito mais dinâmico e com estrutura mais irregular do que a cromatina dos eucariotos, refletindo o ciclo celular mais curto e a grande atividade metabólica de uma célula bacteriana.

Termos-chave

Termos em negrito estão definidos no glossário.

cromossomo 957	densidade de super-hélice (σ) 966
fenótipo 957	topoisômeros 967
mutação 957	topoisomerases 967
gene 958	catenano 968
sequência regulatória 958	plectonêmica 970
plasmídeo 959	solenóide 970
íntron 962	cromatina 972
éxon 962	histonas 972
DNA de sequência simples 962	nucleossomo 972
DNA satélite 962	fibra de 30 nm 975
centrômero 962	epigenético 976
telômero 962	euromatina 976
supertorção 963	heterocromatina 978
DNA relaxado 963	território cromossômico 979
topologia 964	proteínas SMC 979
subenrolamento 964	coesinas 979
número de ligação 965	condensinas 979
diferença de ligação específica 966	nucleóide 979

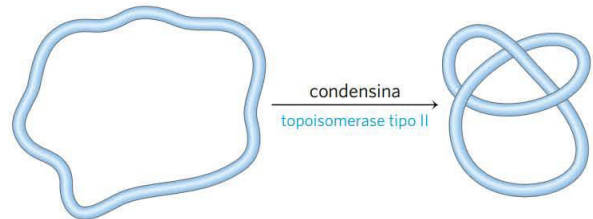
Teste seu conhecimento

- 1. Empacotamento do DNA em um vírus** O bacteriófago T2 tem uma molécula de DNA de peso molecular 120×10^6 , contido em uma cápsula com cerca de 210 nm de comprimento. Calcule o comprimento do DNA (supondo que o peso molecular de um par de nucleotídeos seja 650) e o compare com o tamanho da cápsula do T2.
- 2. O DNA do fago M13** A composição de bases do DNA do fago M13 é A, 23%; T, 36%; G, 21%; C, 20%. O que isso lhe diz a respeito do DNA do fago M13?
- 3. O genoma do *Mycoplasma*** O genoma da bactéria mais simples que se conhece, *Mycoplasma genitalium*, é uma molécula de DNA circular com 580.070 pb. Calcule o peso molecular e o comprimento do contorno (quando relaxado) dessa molécula. Qual o valor de Lk_0 do cromossomo do *Mycoplasma*? Se $\sigma = -0,06$, qual é o valor de Lk ?

4. O tamanho dos genes dos eucarióticos Uma enzima isolada do fígado de rato tem 192 resíduos de aminoácidos e é codificada por um gene com 1.440 pb. Explique a relação entre o número de resíduos de aminoácidos na enzima e o número de pares de nucleotídeos desse gene.

5. Número de ligação Uma molécula de DNA circular fechada, na sua forma relaxada, tem um Lk de 500. Quantos pares de bases, aproximadamente, há nesse DNA? Como o número de ligação é alterado (aumenta, diminui, não muda, é indefinido) quando (a) um complexo proteico se liga, formando um nucleossomo, (b) uma fita de DNA é quebrada, (c) DNA-girase e ATP são adicionados à solução de DNA ou (d) a dupla-hélice é desnaturada pelo calor?

6. Topologia do DNA Na presença de condensina de eucarioto e de topoisomerase tipo II, o Lk de uma molécula de DNA circular fechado e relaxado não muda. Entretanto, o DNA fica cheio de nós.



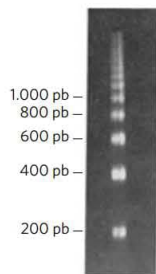
A formação dos nós necessita de quebra do DNA, passagem de um segmento de DNA através da quebra e nova ligação pela topoisomerase. Uma vez que se pode esperar que cada reação da topoisomerase resulte em mudança do número de ligação, como o Lk pode permanecer o mesmo?

7. Densidade da super-hélice O bacteriófago λ infecta *E. coli*, integrando seu DNA no cromossomo bacteriano. O sucesso dessa recombinação depende da topologia do DNA da *E. coli*. Quando a densidade de super-hélice (σ) do DNA de *E. coli* for maior do que $-0,045$, a probabilidade de integração é menor que 20%; quando σ for menor que $-0,06$, a probabilidade é $> 70\%$. O DNA de um plasmídeo isolado de uma cultura de *E. coli* tem comprimento de 13.800 pb e Lk de 1.222. Calcule o σ para esse DNA e estabeleça um prognóstico da probabilidade do bacteriófago λ ser capaz de infectar essa cultura.

8. Alterando o número de ligação (a) Qual é o Lk de uma molécula circular dúplice de DNA de 5.000 pb com quebra em uma das fitas? (b) Qual é o Lk da molécula em (a) quando a quebra é soldada (relaxada)? (c) Quanto o Lk da molécula em (b) seria afetado pela ação, uma única vez, de uma molécula de topoisomerase I de *E. coli*? (d) Qual é o Lk da molécula em (b) após sofrer oito ciclos de catálise por uma molécula de DNA-girase em presença de ATP? (e) Qual é o Lk da molécula em (d) após quatro ciclos de catálise por uma molécula de topoisomerase I bacteriana? (f) Qual é o Lk da molécula em (d) após se ligar a um nucleossomo?

9. Cromatina Uma das primeiras evidências que ajudaram os cientistas a definir a estrutura do nucleossomo está ilustrada no gel de agarose a seguir, no qual as bandas grossas representam DNA. Ele foi feito tratando brevemente a cromatina com uma enzima que degrada DNA e, então, remove toda a proteína e submete o DNA purificado à eletroforese. Os números ao lado do gel indicam a posição na qual um DNA linear com o tamanho indicado migraria. O que esse gel mostra sobre a estrutura da

cromatina? Por que as bandas de DNA são grossas e dispersas, em vez de estarem bem definidas?



[Fonte: cortesia do Dr. Roger D. Kornberg, Stanford University School of Medicine.]

10. Estrutura do DNA Explique por que o subenrolamento da hélice de um B-DNA pode facilitar ou estabilizar a formação de um Z-DNA (ver Figura 8-17).

11. Manutenção da estrutura do DNA (a) Descreva duas características estruturais que uma molécula de DNA precisa ter para se manter em um estado supertorcido negativamente. (b) Liste três mudanças estruturais que são favorecidas quando uma molécula de DNA fica supertorcida negativamente. (c) Qual é a enzima que, com o auxílio do ATP, pode gerar uma super-helicidade negativa no DNA? (d) Descreva o mecanismo físico da ação dessa enzima.

12. Cromossomos artificiais de levedura (YAC) Os YAC são usados para clonar segmentos grandes de DNA em células de levedura. Quais são os três tipos de sequência de DNA necessários para garantir a replicação e a propagação adequadas de um YAC em células de levedura?

13. Estrutura do nucleóide em bactéria Em bactérias, a transcrição de um conjunto de genes é afetada pela topologia do DNA, sendo que a expressão aumenta ou, mais frequentemente, diminui quando o DNA é relaxado. Quando o cromossomo de uma bactéria é clivado em um ponto específico por uma enzima de restrição (enzima que cliva em uma sequência longa e, portanto, rara), apenas os genes das proximidades (10.000 pb) mostram aumento ou diminuição da expressão. A transcrição dos genes em outros sítios do cromossomo não é afetada. Explique. (Dica: ver Figura 24-35.)

14. Topologia do DNA Quando o DNA é submetido à eletroforese em gel de agarose, as moléculas menores migram mais rápido do que as moléculas longas. DNA circulares fechados do mesmo tamanho, mas com diferentes números de ligação, também podem ser separados em gel de agarose: topoi-

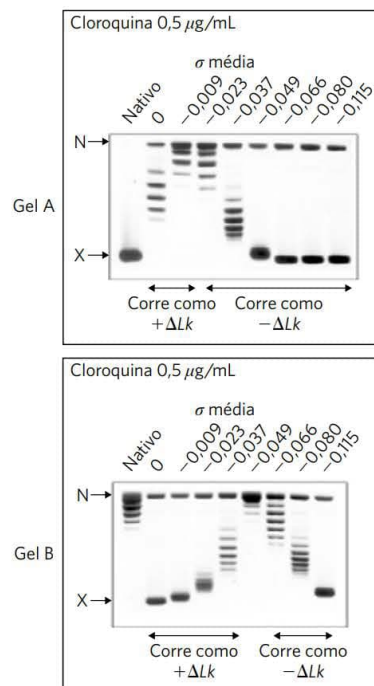


[Fonte: cortesia de Michael Cox Laboratory.]

sômeros mais supertorcidos e, portanto, mais condensados migram mais rapidamente através do gel. No gel mostrado abaixo, o DNA de plasmídeo purificado migrou da parte superior para a parte inferior. Existem duas bandas, como a banda mais rápida bem mais proeminente.

(a) Quais são as espécies de DNA nas duas bandas? (b) Se topoisomerase for adicionada a uma solução desse DNA, o que acontecerá com a banda da parte superior e a banda da parte inferior após a eletroforese? (c) Se DNA-ligase for adicionada ao DNA, a aparência das bandas mudará? Explique sua resposta. (d) Se DNA-girase mais ATP for adicionado ao DNA após a adição de DNA-ligase, como mudará o padrão de bandas?

15. DNA-topoisomerases Quando o DNA é submetido à eletroforese em gel de agarose, as moléculas menores migram mais rápido do que as moléculas longas. DNA circulares do mesmo tamanho, mas com diferenças quanto ao número de ligação, também podem ser separados em gel de agarose, pois os topoisômeros supertorcidos, e, portanto, mais condensados, migram mais rapidamente no gel – da parte superior para a parte inferior dos géis mostrados a seguir. Um corante, cloroquina, foi adicionado a esses géis. A cloroquina se intercala entre os pares de base e estabiliza uma estrutura de DNA mais desenrolada. Quando o gel se liga a um DNA circular relaxado, o DNA fica subenrolado onde o corante se liga, e as regiões onde o corante não se liga ficam com supertorções positivas para compensar. No experimento aqui mostrado, foram usadas topoisomerases para preparar o mesmo DNA circular com diferentes densidades de super-hélice (σ). O DNA completamente relaxado migra para a posição marcada com Q (de *quebra*), e o DNA altamente supertorcido (acima do limite no qual os topoisômeros podem ser individualizados) migra para a posição marcada com X.



[Fonte: R. P. Bowater (2005) "Supercoiled DNA: structure," na *Encyclopedia of Life Sciences*, doi:10.1038/npg.els.0006002, John Wiley & Sons, Inc./ Wiley InterScience. www.els.net.]

- (a) No gel A, por que a canaleta de $\sigma = 0$ (i.e., DNA preparado de modo a ter $\sigma = 0$, em média) tem muitas bandas?
- (b) No gel B, o DNA da preparação $\sigma = 0$ está supertorcido negativa ou positivamente na presença do corante?
- (c) Nos dois géis, a canaleta de $\sigma = -0,115$ tem duas bandas, uma com DNA relaxado e outra com DNA altamente supertorcido. Proponha uma razão para a presença de DNA relaxado nessas (e em outras) canaletas.
- (d) O DNA nativo (mais à esquerda nos dois géis) é o mesmo DNA circular isolado das bactérias e que não recebeu tratamento. Qual é, aproximadamente, a densidade de super-hélice desse DNA nativo?

16. Nucleossomos O genoma humano compreende pouco mais de 3,1 bilhões de pares de bases. Supondo que contém nucleossomos que estão espaçados como descrito neste capítulo, quantas moléculas de histona H2A estão presentes em uma célula humana somática? (Ignore as reduções no H2A devido à sua substituição em algumas regiões por variantes do H2A.) Como o número mudaria após a replicação do DNA, mas antes da divisão celular?

Problema de análise de dados

17. Definindo os elementos funcionais dos cromossomos de levedura A Figura 24-8 mostra os elementos estruturais principais de um cromossomo de levedura de pão (*Saccharomyces cerevisiae*). As propriedades de alguns desses elementos foram determinadas por Heiter, Mann, Snyder e Davis (1985). Eles basearam seu estudo no achado de que, em células de levedura, os plasmídeos (que têm genes e origem de replicação próprios) agem, durante a mitose, diferentemente dos cromossomos (que têm esses elementos e ainda centrômeros e telômeros). Os plasmídeos não são manipulados pela maquinaria da mitose e segregam-se aleatoriamente entre as células-filhas. Sem um marcador seletivo que force a célula hospedeira a retê-los (ver Figura 9-4), esses plasmídeos são perdidos rapidamente. De maneira oposta, os cromossomos, mesmo sem marcador seletivo, são manipulados pela maquinaria da mitose e são perdidos a uma taxa muito baixa (cerca de 10^{-5} por divisão celular).

Heiter e colaboradores usaram como estratégia para determinar os componentes importantes dos cromossomos de levedura a construção de plasmídeos com várias partes dos cromossomos, observando, então, o quanto esses “cromossomos sintéticos” eram adequadamente segregados durante a mitose. Para medir a taxa de diferentes tipos de falha na segregação dos cromossomos, os pesquisadores precisaram de um ensaio rápido para determinar o número de cópias de cromossomos sintéticos presente em diferentes células. Esse ensaio se aproveitou do fato de que as colônias de levedura da linhagem selvagem são brancas, ao passo que certos mutantes que precisam de adenina (*ade⁻*) produzem colônias vermelhas no meio de cultura; células *ade2⁻* não têm AIR-carboxilase funcional (a enzima da etapa 3a na Figura 22-35) e acumulam AIR (5-aminoimidazol-ribonucleotídeo) no citoplasma, e o excesso de AIR é convertido em um pigmento vermelho. A outra parte do ensaio envolve o gene *SUP11*, que codifica um supressor ocre (tipo de supressor sem sentido; ver Quadro 27-3), que suprime o fenótipo de alguns mutantes *ade2⁻*.

Heiter e colaboradores começaram com uma linhagem de levedura diploide e homozigota para *ade2⁻* (essas células

são vermelhas). Quando células mutantes contêm uma cópia de *SUP11*, o defeito metabólico é parcialmente suprimido, e as células são rosadas. Quando as células contêm duas ou mais cópias de *SUP11*, o defeito é completamente suprimido, e as células são brancas.

Os pesquisadores inseriram uma cópia de *SUP11* em cromossomos sintéticos com vários elementos que supunham serem importantes para a função dos cromossomos e observaram o quanto esses cromossomos passavam de uma geração a outra. As células rosadas foram plaqueadas em meio não seletivo, e o comportamento dos cromossomos sintéticos foi observado. De modo específico, Heiter e colaboradores procuravam colônias nas quais os cromossomos sintéticos eram inadequadamente segregados na primeira divisão celular após o plaqueamento, dando início a colônias com metade de um genótipo e metade de outro. Uma vez que as células de levedura não se movimentam, essas colônias eram setorizadas: metade da colônia era de uma cor e metade de outra cor.

- (a) Uma das maneiras de falha no processo mitótico é a *não disjunção*: os cromossomos replicam-se, mas as cromátides-irmãs não se separam, e, assim, ambas as cópias do cromossomo terminam na mesma célula-filha. Explique por que a não disjunção dos cromossomos sintéticos origina colônias que são metade vermelha e metade branca.
- (b) Outra maneira de falha no processo da mitose é a *perda de cromossomos*: os cromossomos não entram no núcleo das células-filhas ou não replicam. Explique por que a perda de cromossomos sintéticos dá origem a colônias metade vermelha e metade rosada.

Calculando a frequência dos diferentes tipos de colônia, Heiter e colaboradores puderam estimar a frequência desses eventos mitóticos aberrantes com os diferentes tipos de cromossomos sintéticos. Inicialmente, eles investigaram a necessidade de sequências centroméricas, construindo cromossomos sintéticos com fragmentos de DNA de diferentes tamanhos contendo um centrômero conhecido. Os resultados são mostrados a seguir.

Cromossomo sintético	Tamanho do centrômero: contendo fragmento (kpb)	Cromossomo perda (%)	Não disjunção (%)
1	Nenhum	—	> 50
2	0,63	1,6	1,1
3	1,6	1,9	0,4
4	3,0	1,7	0,35
5	6,0	1,6	0,35

- (c) Com base nesses dados, o que você pode concluir sobre o tamanho que o centrômero deve ter para uma segregação mitótica normal? Explique o raciocínio utilizado.
- (d) É interessante observar que todos os cromossomos sintéticos criados nesses experimentos eram circulares e sem telômeros. Explique como eles conseguiram se replicar mais ou menos adequadamente.

A seguir, Heiter e colaboradores construíram uma série de cromossomos sintéticos lineares que incluíam sequências funcionais de centrômeros e telômeros e então mediram a taxa total de erro mitótico (% perda + % de não disjunção) em função do tamanho:

Cromossomo sintético	Tamanho (kpb)	Frequência total de erro (%)
6	15	11,0
7	55	1,5
8	95	0,44
9	137	0,14

- (e) Com base nesses dados, o que se pode concluir sobre o tamanho que um cromossomo deve ter para uma segregação mitótica normal? Explique o raciocínio utilizado.
- (f) Os cromossomos normais de levedura são lineares, com comprimento variando de 250 kpb a 2.000 kpb, e têm, como observado acima, taxa de erro mitótico de cerca

de 10^{-5} por divisão celular. Extrapolando os resultados de (e), as sequências de telômeros e centrômeros usadas nesses experimentos explicam a estabilidade mitótica de cromossomos normais de levedura ou deve haver o envolvimento de outros elementos? Explique o raciocínio utilizado. (Dica: um gráfico do log da taxa de erro *versus* o comprimento será útil.)

Referência

Heiter, P., C. Mann, M. Snyder e R.W. Davis. 1985. Mitotic stability of yeast chromosomes: a colony color assay that measures nondisjunction and chromosome loss. *Cell* 40:381–392.

Esta página foi deixada em branco intencionalmente.

Metabolismo do DNA

25.1 Replicação do DNA 989

25.2 Reparo do DNA 1005

25.3 Recombinação do DNA 1016

Como repositório de informação genética, o DNA ocupa um lugar único e central entre as macromoléculas biológicas. As sequências de nucleotídeos de DNA codificam as estruturas primárias de todos os RNA e proteínas celulares e, por meio de enzimas, afetam indiretamente a síntese de todos os outros constituintes celulares. Essa passagem de informação do DNA para o RNA e proteínas orienta o tamanho, a forma e o funcionamento de todos os seres vivos.

O DNA é um dispositivo maravilhoso para o armazenamento estável da informação genética. A expressão “armazenamento estável”, entretanto, transmite uma imagem estática e enganosa. Ela não consegue captar a complexidade dos processos pelos quais a informação genética é preservada em um estado não corrompido e, então, transmitida de uma geração de células para a seguinte. O metabolismo do DNA compreende tanto o processo que dá origem a cópias fiéis de moléculas de DNA (replicação) quanto os processos que afetam a estrutura inerente da informação (reparo e recombinação). Juntas, essas atividades são o foco deste capítulo.

O metabolismo do DNA é moldado pela exigência de um grau de requinte de precisão. A química da junção de um nucleotídeo com o seguinte na replicação do DNA é elegante e aparentemente simples. No entanto, como acontece em todos os polímeros que contêm informações, formar uma ligação covalente entre duas unidades monoméricas é apenas uma pequena parte do processo bioquímico. Como será visto, a complexidade surge na forma de dispositivos enzimáticos para garantir que o nucleotídeo *correto* e que a informação genética seja transmitida intacta. Erros não corrigidos que surgem durante a síntese do DNA podem ter terríveis consequências, não só porque podem afetar ou eliminar permanentemente a função de um gene, mas também porque a alteração é hereditária.

As enzimas que sintetizam o DNA podem copiar moléculas de DNA que contêm milhões de bases. Elas o fazem com

fidelidade e velocidade extraordinárias, apesar de o substrato de DNA ser altamente compactado e ligado a outras proteínas. A formação das ligações de fosfodiésteres para unir nucleotídeos no esqueleto de uma fita de DNA em formação é, portanto, apenas parte de um processo elaborado que requer inúmeras proteínas e enzimas.

Manter a integridade da informação genética encontra-se no centro do reparo do DNA. Como detalhado no Capítulo 8, o DNA é suscetível a vários tipos de reações que o danificam. Essas reações são incomuns, mas significativas, devido à tolerância biológica muito baixa a alterações na sequência do DNA. O DNA é a única macromolécula para a qual existem sistemas de reparo; o número, a diversidade e a complexidade dos mecanismos de reparo do DNA refletem a ampla variedade de injúrias que podem danificá-lo.

As células podem reorganizar a sua informação genética por processos coletivamente chamados de recombinação – aparentemente minando o princípio de que a estabilidade e a integridade da informação genética são fundamentais. Todavia, a maioria dos rearranjos de DNA, de fato, desempenha papéis construtivos na manutenção da integridade genômica, contribuindo de modo especial para a replicação do DNA, o reparo do DNA e a segregação cromossômica.

Ênfase especial é dada neste capítulo às *enzimas* do metabolismo do DNA. Elas merecem estudo cuidadoso não apenas por sua importância biológica intrínseca, mas também por sua crescente importância na medicina e por sua utilização diária como reagentes em uma ampla variedade de tecnologias bioquímicas modernas. Muitas das descobertas importantes no metabolismo do DNA foram feitas com a *Escherichia coli*, por isso suas enzimas bem conhecidas são geralmente utilizadas para ilustrar as regras básicas. Uma rápida olhada em alguns genes relevantes no mapa genético de *E. coli* (**Figura 25-1**) fornece apenas uma sugestão da complexidade dos sistemas enzimáticos envolvidos no metabolismo do DNA.

Antes de um olhar mais próximo na replicação, deve-se fazer um comentário sobre o uso de abreviaturas na identificação de genes de bactérias e proteínas – você encontrará muitas delas neste capítulo e nos capítulos posteriores.

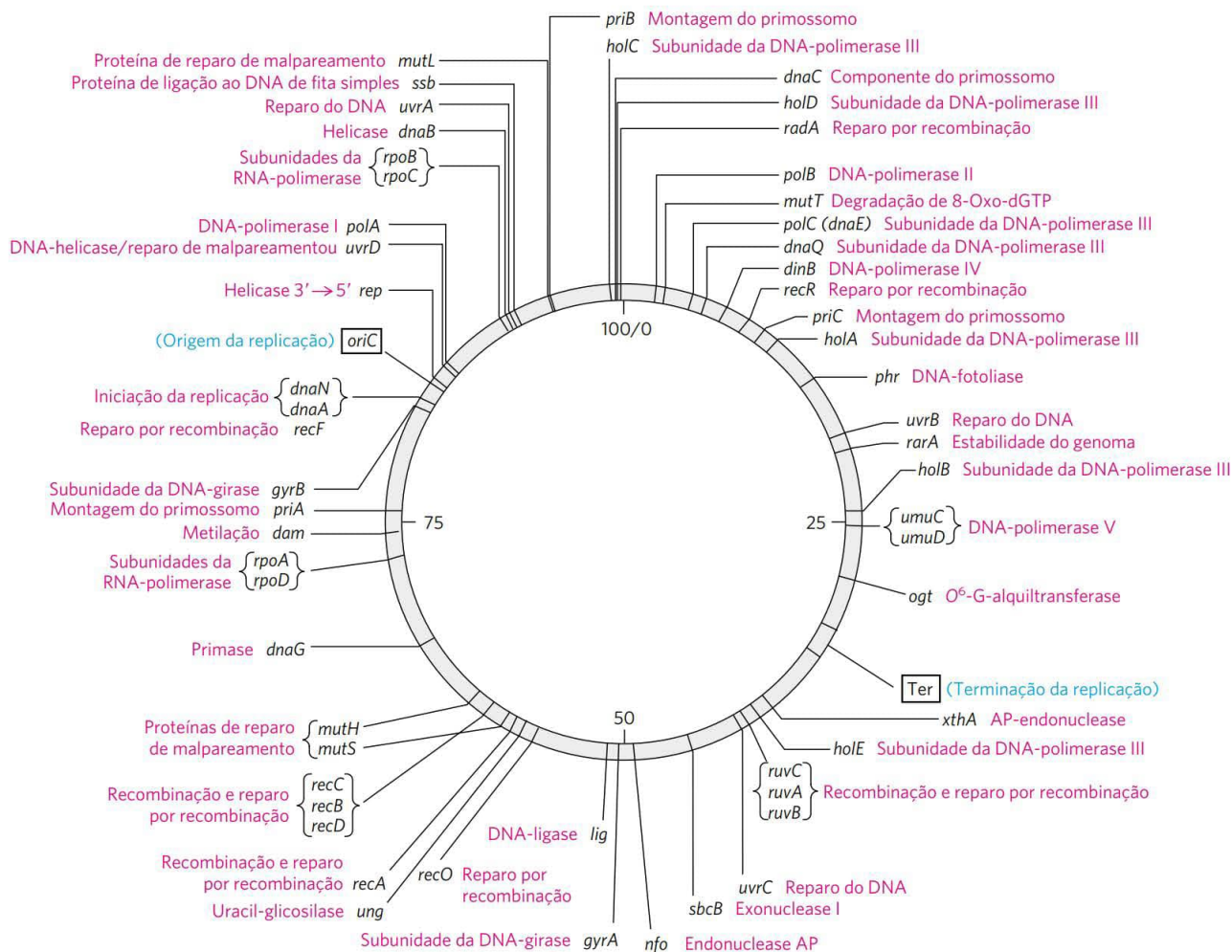


FIGURA 25-1 Mapa do cromossomo de *E. coli*. O mapa mostra as posições relativas dos genes que codificam muitas das proteínas importantes no metabolismo do DNA. O número de genes envolvidos fornece uma dica a respeito da complexidade destes processos. Os números 0 a 100 dentro do cromossomo circular indicam uma medida genética chamada de minutos. Cada minuto corresponde a aproximadamente 40.000 pb ao longo da molécula de DNA. Os nomes dos genes em três letras e outros elementos geralmente refletem algum aspecto da sua função e incluem, por exemplo: *mut*, mutagenese; *dna*, replicação do DNA; *pol*, DNA-polimerase; *rpo*, RNA-polimerase; *uvr*, resistência à UV; *rec*, recombinação; *dam*, metilação de adeninas no DNA; *lig*, DNA-ligase; *Ter*, terminação da replicação; e *ori*, origem da replicação (*oriC* em *E. coli*, como mostrado nesta figura).

>> Convenção-chave: genes bacterianos, em geral, são identificados utilizando-se três letras minúsculas, em itálico, que, muitas vezes, refletem a função aparente de um gene. Por exemplo, os genes *dna*, *uvr* e *rec* afetam a replicação do DNA, a resistência aos efeitos nocivos da radiação UV e a recombinação, respectivamente. Quando vários genes afetam o mesmo processo, as letras A, B, C, e assim por diante, são adicionadas – por exemplo, *dnaA*, *dnaB*, *dnaQ* –, geralmente refletindo sua ordem de descoberta e não a sua ordem em uma sequência de reação. Os genes eucarióticos também são identificados por convenções semelhantes, embora a forma exata das abreviações possa variar de acordo com as espécies e nenhuma convenção única se aplica a todos os sistemas eucarióticos. Por exemplo, na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, nomes de genes são geralmente três

letras maiúsculas seguidas por um número, todos em itálico (p. ex., o gene *COX1* codifica uma subunidade da citocromo-oxidase [Capítulo 19]). Os nomes de genes que antecedem as convenções atuais podem ter formato diferente. <<

A utilização de abreviaturas na nomeação de proteínas é menos direta. Durante investigações genéticas, o produto proteico de cada gene é geralmente isolado e caracterizado. Muitos genes bacterianos são identificados e denominados antes que os papéis de seus produtos proteicos sejam compreendidos em detalhes. Às vezes, descobre-se que o produto gênico é uma proteína isolada previamente, e ocorrem algumas renomeações. Frequentemente, no entanto, o produto vem a ser uma proteína ainda desconhecida, com uma atividade não descrita facilmente por um simples nome de enzima.

» **Convenção-chave:** proteínas bacterianas muitas vezes mantêm o nome de seus genes. Ao se referir ao produto proteico de um gene de *E. coli*, utiliza-se o tipo romano e a primeira letra é maiúscula: por exemplo, os produtos gênicos *dnaA* e *recA* e as proteínas DnaA e RecA, respectivamente. As convenções para proteínas eucarióticas são novamente complexas. Para leveduras, algumas proteínas têm nomes comuns longos (como a citocromo-oxidase). Outras têm o mesmo nome que o gene, nesse caso o nome da proteína tem uma letra maiúscula e duas letras minúsculas, seguido por um número e a letra “p”, todos em tipo romano (como Rad51p). O “p” é para enfatizar que essa é uma proteína e para evitar confusão com convenções de nomenclatura para outros organismos. «

25.1 Replicação do DNA

Muito antes da estrutura do DNA ser conhecida, os cientistas queriam conhecer a origem da capacidade dos organismos de criar cópias fiéis de si mesmos e, mais tarde, a respeito da capacidade das células de produzirem cópias idênticas de macromoléculas grandes e complexas. A especulação sobre esses problemas se concentrou em torno do conceito de **molde**, estrutura que permitiria que as moléculas se alinhassem em uma ordem específica e se ligassem, criando uma macromolécula com sequência e função específicas. A década de 1940 trouxe a revelação de que o DNA era a molécula genética, mas só depois de James Watson e Francis Crick deduzirem sua estrutura, realmente se tornou claro o mecanismo pelo qual o DNA atuava como molde para a replicação e a transmissão da informação genética: *uma fita é o complemento da outra*. As regras estritas do pareamento de bases significam que cada fita fornece um molde para uma nova fita com uma sequência previsível e complementar (ver Figuras 8-14, 8-15).

Ficou provado que as propriedades fundamentais do processo de replicação do DNA e os mecanismos utilizados pelas enzimas que o catalisam são, em essência, idênticos em todas as espécies. Essa unidade de mecanismos é um tema central à medida que se prossegue a partir de propriedades gerais do processo de replicação para a replicação de enzimas de *E. coli* e, por fim, para a replicação em eucariotos.

A replicação do DNA segue um conjunto de regras fundamentais

A pesquisa inicial sobre a replicação do DNA bacteriano e suas enzimas ajudou a estabelecer várias propriedades básicas que se mostraram aplicáveis à síntese do DNA em todos os organismos.

A replicação do DNA é semiconservativa Cada fita de DNA funciona como molde para a síntese de uma nova fita, produzindo duas novas moléculas de DNA, cada qual com uma fita nova e uma fita antiga. Isso é a **replicação semiconservativa**.

Watson e Crick propuseram a hipótese de replicação semiconservativa logo após a publicação de seu artigo de 1953 sobre a estrutura do DNA e a hipótese foi compro-

vada por experimentos engenhosamente projetados, realizados por Matthew Meselson e Franklin Stahl, em 1957. Meselson e Stahl cultivaram células de *E. coli* por várias gerações em um meio em que a única fonte de nitrogênio (NH_4Cl) continha ^{15}N , o isótopo “pesado” de nitrogênio, no lugar do isótopo normal ^{14}N , “leve”, mais abundante. O DNA isolado dessas células apresentava uma densidade de cerca de 1% maior do que o normal [^{14}N]DNA (**Figura 25-2a**). Embora essa diferença seja pequena, a mistura de [^{15}N]DNA pesado e [^{14}N]DNA leve pode ser separada por centrifugação até o equilíbrio em um gradiente de densidade de cloreto de cério.

As células de *E. coli* cultivadas em um meio de ^{15}N foram transferidas para um novo meio contendo apenas o isótopo ^{14}N , em que foram deixadas crescendo até que sua população tivesse dobrado. O DNA isolado dessa primeira geração de células formava uma *única* banda no gradiente de CsCl , em uma posição que indicava que as moléculas de DNA de dupla-hélice das células-filhas eram híbridas, contendo uma nova fita ^{14}N e uma fita parental ^{15}N (Figura 25-2b).

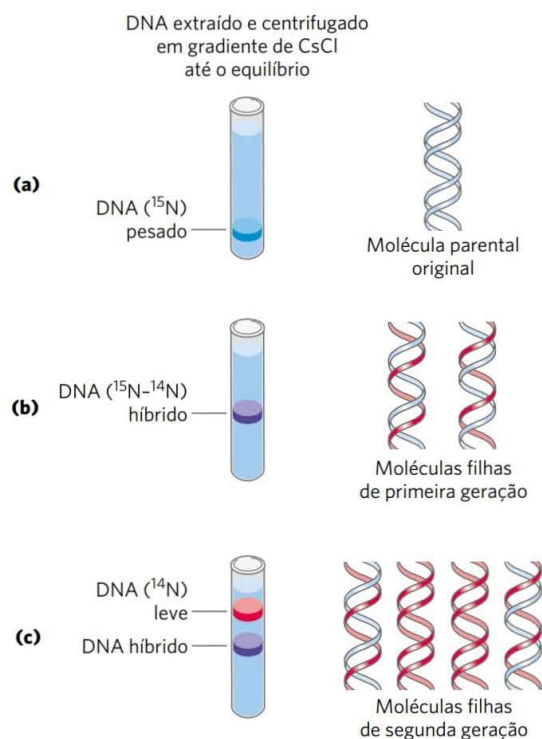


FIGURA 25-2 Experimento de Meselson-Stahl. (a) Células foram cultivadas por muitas gerações em meio contendo apenas nitrogênio pesado, ^{15}N , de modo que todo o nitrogênio no DNA fosse ^{15}N , como mostrado pela banda única (em azul), quando centrifugado em um gradiente de CsCl . (b) Uma vez que as células foram transferidas para um meio contendo apenas nitrogênio leve, ^{14}N , o DNA celular isolado após uma geração se equilibrou em uma posição mais alta no gradiente de densidade (banda roxa). (c) Um segundo ciclo de replicação gerou uma banda de DNA híbrido (em roxo) e outra banda (em vermelho), contendo apenas [^{14}N]DNA, confirmando a replicação semiconservativa.

Esse resultado argumentou contra a replicação conservativa, a hipótese alternativa em que um dos resultados da replicação de uma molécula de DNA consistiria em duas fitas recém-sintetizadas de DNA e a outra conteria as duas fitas parentais; isso não produziria moléculas de DNA híbridas no experimento de Meselson-Stahl. A etapa seguinte do experimento reforçou ainda mais a hipótese semiconservativa (Figura 25-2c). As células foram novamente colocadas em crescimento até dobrar em número em um meio com ^{14}N . O produto de DNA isolado desse segundo ciclo de replicação exibiu *duas* bandas no gradiente de densidade, uma com densidade igual àquela do DNA leve e a outra com a densidade do DNA híbrido observada após a primeira duplicação celular.

A replicação começa em uma origem e, em geral, segue bidirecionalmente Após a confirmação de um mecanismo de replicação semiconservativo, várias questões surgiram. As fitas de DNA parentais são completamente desenroladas antes que cada uma seja replicada? A replicação se inicia em locais aleatórios ou em um único ponto? Após a iniciação em qualquer ponto do DNA, a replicação segue em uma direção ou em ambas?

Uma indicação inicial de que a replicação é um processo altamente coordenado, no qual as fitas parentais são simultaneamente desenroladas e replicadas, foi fornecido por John Cairns, utilizando autorradiografias. Ele produziu um DNA de *E. coli* radioativo, cultivando células em um meio contendo timidina marcada com trítio (^3H). Quando o DNA foi cuidadosamente isolado, espalhado e coberto com uma emulsão fotográfica por várias semanas, os resíduos de timidina radioativos geraram “rastros” de grãos de prata na emulsão, produzindo uma imagem da molécula de DNA. Esses rastros revelaram que o cromossomo intacto de *E. coli* é um círculo único enorme, com 1,7 mm de comprimento. O DNA radioativo isolado das células durante a replicação mostrou uma volta adicional (**Figura 25-3**). Cairns concluiu que a volta resultava da formação de duas fitas-filhas radioativas, cada uma complementar a uma fita parental. Uma ou ambas as extremidades da volta são pontos dinâmicos, denominados **forquilha de replicação**, onde o DNA parental está sendo desenrolado e as fitas separadas rapidamente replicadas. Os resultados de Cairns demonstraram que ambas as fitas de DNA são replicadas simultaneamente, e variações no seu experimento indicaram que a replicação de cromossomos bacterianos é bidirecional: ambas as extremidades da volta possuem forquilhas de replicação ativas.

Determinar se as voltas de replicação se originam em um único ponto no DNA requer marcações ao longo da molécula de DNA. Elas foram fornecidas por uma técnica chamada de **mapeamento de desnaturação**, desenvolvida por Ross Inman e colaboradores. Utilizando o cromossomo de 48.502 pb do bacteriófago λ , Inman demonstrou que o DNA poderia ser seletivamente desnaturado em sequências extraordinariamente ricas em pares de bases A=T, gerando um padrão reproduzível de bolhas de fitas simples (ver Figura 8-28). O DNA isolado contendo voltas de replicação pode ser parcialmente desnaturado do mesmo modo. Isso permite que a posição e o progresso das forquilhas de replicação sejam

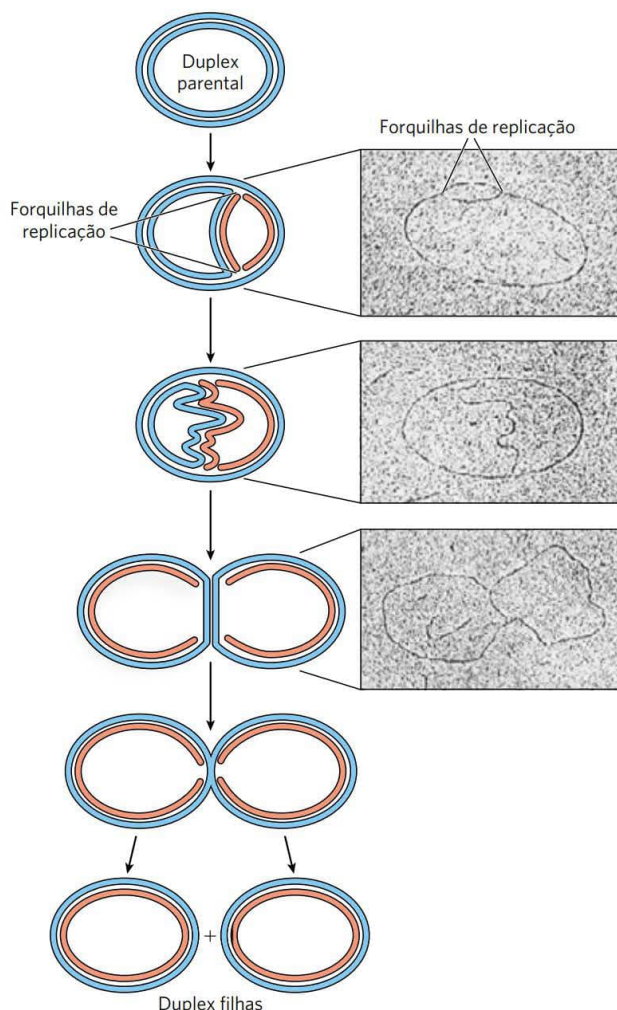


FIGURA 25-3 Visualização da replicação do DNA. Os estágios na replicação das moléculas de DNA circular foram visualizados na microscopia eletrônica. A replicação de um cromossomo circular produz uma estrutura que lembra a letra grega teta, θ , uma vez que ambas as fitas são replicadas simultaneamente (novas fitas mostradas em cor salmão). As eletromicrografias mostram imagens de plasmídeos de DNA sendo replicados a partir de uma única origem de replicação. [Fonte: micrografias eletrônicas: J. Cairns, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 28:44, 1963.]

medidos e mapeados, utilizando as regiões desnaturadas como pontos de referência. A técnica revelou que, nesse sistema, as voltas de replicação sempre se iniciam em um único ponto, chamado de **origem**. Ela também confirmou a observação inicial de que a replicação é geralmente bidirecional. Para moléculas de DNA circulares, as duas forquilhas de replicação encontram-se em um ponto do lado do círculo oposto ao de origem. Origens específicas de replicação já foram identificadas e caracterizadas em bactérias e eucariotos inferiores.

A síntese de DNA segue na direção 5'→3' e é semidescontínua Uma nova fita de DNA é sempre sintetizada na direção 5'→3',

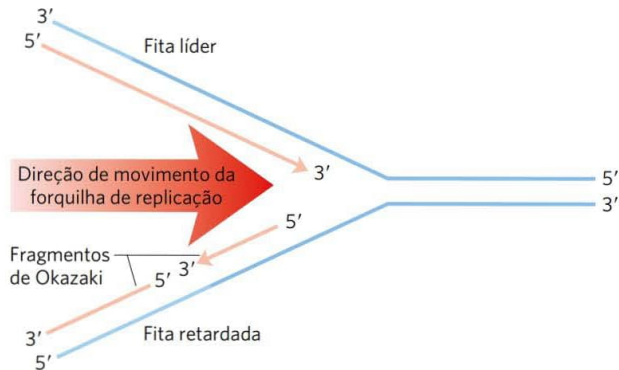


FIGURA 25-4 Definindo as fitas de DNA na forquilha de replicação.

Uma nova fita de DNA (em vermelho-claro) é sempre sintetizada na direção 5'→3'. O molde é lido na direção oposta, 3'→5'. A fita-líder é sintetizada continuamente na direção adotada pela forquilha de replicação. A outra fita, tardia, é sintetizada descontinuamente em pequenos pedaços (fragmentos de Okazaki) em uma direção oposta àquela em que a forquilha de replicação se move. Os fragmentos de Okazaki são ligados pela DNA-ligase. Em bactérias, os fragmentos de Okazaki têm aproximadamente 1.000 a 2.000 nucleotídeos. Nas células de eucariotos eles têm de 150 a 200 nucleotídeos de comprimento.

com a extremidade 3'-OH livre como o ponto no qual o DNA é alongado. (Ver p. 283 para a definição das extremidades 5' e 3' de uma fita de DNA.) Como as duas fitas de DNA são antiparalelas, a fita que serve de molde é lida a partir da extremidade 3' em direção à extremidade 5'.

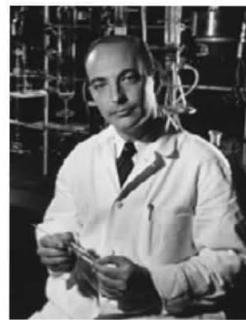
Se a síntese sempre segue na direção 5'→3', como ambas as fitas podem ser sintetizadas simultaneamente? Se ambas as fitas fossem sintetizadas *continuamente* enquanto a forquilha de replicação se movimentava, uma fita teria de ser sintetizada na direção 3'→5'. Esse problema foi resolvido por Reiji Okazaki e colaboradores na década de 1960. Okazaki descobriu que uma das novas fitas de DNA é sintetizada em pedaços pequenos, atualmente denominados **fragmentos de Okazaki**. Esse trabalho levou à conclusão de que uma fita é sintetizada continuamente, e a outra, descontinuamente (**Figura 25-4**). A fita contínua, ou **fita-líder**, é aquela que a síntese 5'→3' segue na *mesma* direção da movimentação da forquilha de replicação. A fita descontínua, ou **fita tardia**, é aquela em que a síntese 5'→3' segue na direção *oposta* da direção do movimento da forquilha. Os fragmentos de Okazaki têm geralmente de 100 a 200 nucleotídeos em eucariotos e de 1.000 a 2.000 nucleotídeos em bactérias. Como será visto adiante, as sínteses da fita-líder e da fita tardia são fortemente coordenadas.

O DNA é degradado por nucleases

Para explicar a enzimiologia da replicação do DNA, serão apresentadas inicialmente as enzimas que degradam o DNA, em vez de sintetizá-lo. Essas enzimas são conhecidas como **nucleases** ou **DNases**, se forem específicas para o DNA, e não para RNA. Cada célula contém várias nucleases diferentes, pertencendo a dois tipos de classes amplas: exonucleases e endonucleases. As **exonucleases** degradam os ácidos

nucleicos de uma extremidade da molécula. Muitas atuam apenas na direção 5'→3' ou 3'→5', removendo nucleotídeos apenas a partir da extremidade 5' ou 3', respectivamente, de uma fita de um ácido nucleico de dupla-fita ou de um DNA de fita simples. As **endonucleases** podem iniciar a degradação em sítios internos específicos em uma fita ou molécula de ácido nucleico, reduzindo-a a fragmentos cada vez menores. Poucas exonucleases e endonucleases degradam apenas DNA de fita simples. Existem poucas importantes classes de endonucleases que clivam apenas em sequências específicas de nucleotídeos (como as endonucleases de restrição, tão importantes em biotecnologia; ver Capítulo 9, Figura 9-2). Você encontrará muitos tipos de nucleases neste e em capítulos subsequentes.

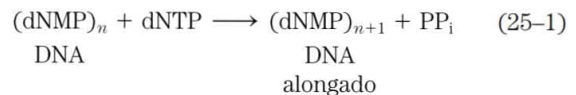
O DNA é sintetizado por DNA-polimerases



Arthur Kornberg, 1918-2007
[Fonte: World History Archive/Alamy.]

A busca por uma enzima que poderia sintetizar o DNA começou em 1955. O trabalho de Arthur Kornberg e colaboradores levou à purificação e à caracterização de uma DNA-polimerase de células de *E. coli*, uma enzima de um único polipeptídeo, atualmente denominada **DNA-polimerase I** (M_r 103.000; codificada pelo gene *polA*). Bem mais tarde, pesquisadores descobriram que *E. coli* contém, pelo menos, quatro outras DNA-polimerases distintas, descritas a seguir.

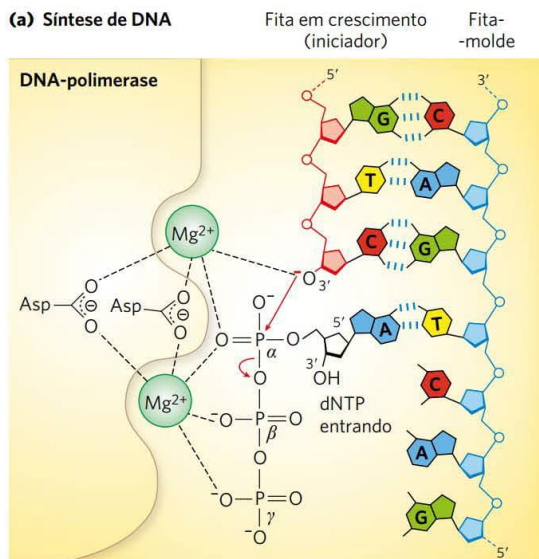
Estudos detalhados da DNA-polimerase I revelaram características do processo de síntese do DNA, que, agora, sabe-se serem comuns a todas as DNA-polimerases. A reação fundamental é a transferência do grupo fosforila. O nucleófilo é o grupo 3'-hidroxila do nucleotídeo na extremidade 3' da fita em crescimento. O ataque nucleofílico ocorre no fósforo α do desoxinucleosídeo-5'-trifosfato (**Figura 25-5a**). O pirofosfato inorgânico é liberado na reação. A reação geral é



em que dNMP e dNTP são desoxinucleosídeos-5'-monofosfato e 5'-trifosfato, respectivamente. A catálise por praticamente todas as DNA-polimerases envolve principalmente dois íons de Mg^{2+} no sítio ativo (**Figura 25-5a**). Um desses auxilia a retirar o próton do grupo 3'-hidroxila, tornando-o um nucleófilo mais eficaz. O outro se liga ao dNTP de entrada e facilita sua saída do pirofosfato.

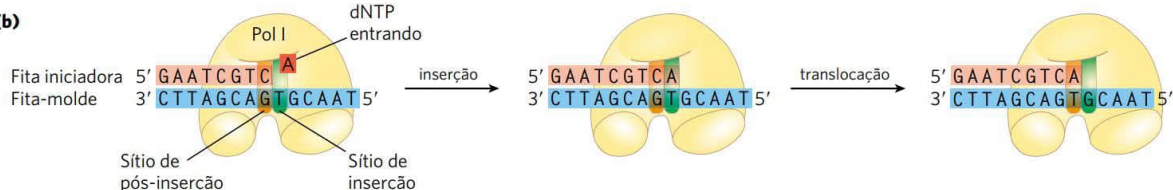
A reação parece prosseguir com apenas uma alteração mínima na energia livre, uma vez que uma ligação fosfodiéster é formada à custa de um anidrido-fosfato um pouco menos estável. Entretanto, o empilhamento de bases não covalentes e as interações de pareamento de bases fornecem estabilidade adicional ao produto alongado de DNA em relação ao nucleotídeo livre. Além disso, a formação de

(a) Síntese de DNA

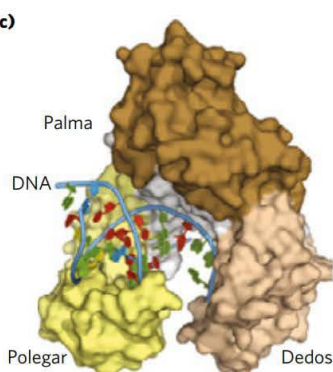


MECANISMO-FIGURA 25-5 Alongamento da cadeia de DNA. (a) O mecanismo catalítico para a adição de um novo nucleotídeo pela DNA-polimerase envolve dois íons Mg^{2+} , coordenados aos grupos fosfato do nucleotídeo trifosfato que chega ao grupo 3' hidroxila que atuará como nucleófilo e três resíduos Asp, dois dos quais são altamente conservados em todas as DNA-polimerases. O íon Mg^{2+} representado na parte superior ataca o grupo 3'-hidroxila do iniciador no fosfato α do nucleotídeo trifosfato; o outro íon Mg^{2+} facilita o deslocamento do pirofosfato. Ambos os íons estabilizam a estrutura do estado de transição pentacovalente. As RNA-polimerases usam um mecanismo semelhante (ver Figura 26-1a). (b) A atividade da DNA-polimerase I também precisa de uma fita simples não pareada para atuar como molde e uma fita iniciadora para fornecer o grupo hidroxila livre na extremidade 3', à qual a nova unidade de nucleotídeo é adicionada. Cada nucleotídeo que chega é selecionado, em parte, pelo pareamento de bases ao nucleotídeo apropriado na fita-molde. O produto da reação tem uma nova hidroxila 3' livre, permitindo a adição de outro nucleotídeo. O par de bases recém-formado migra para deixar o sítio ativo disponível para o próximo par a ser formado. (c) O núcleo da maioria das polimerases tem um formato semelhante ao de uma mão humana que envolve o sítio ativo. A estrutura mostrada aqui é a DNA-polimerase I de *Thermus aquaticus*, ligado ao DNA. (d) Uma interpretação do desenho da estrutura da DNA-polimerase mostra as partes de inserção e pós-inserção no sítio ativo. O sítio de inserção é onde ocorre a adição do nucleotídeo e o sítio de pós-inserção é o local para onde o par de bases recém-formado migra. [Fonte: (c) PDB ID 4KTQ, Y. Li et al., *EMBO J.* 17:7514, 1998.]

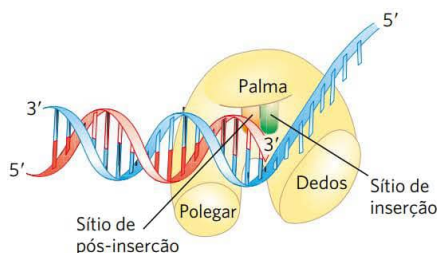
(b)



(c)



(d)



produtos é facilitada na célula pelos 19 kJ/mol gerados na hidrólise posterior do produto pirofosfato, pela enzima pirofosfatase (p. 513).

Trabalhos recentes com a DNA-polimerase I levaram à definição de duas exigências centrais para a polimerização do DNA (Figura 25-5). Em primeiro lugar, todas as DNA-polimerases precisam de um molde. A reação de polimerização é guiada por uma fita-molde de DNA, de acordo com as regras de pareamento de bases previstas por Watson e Crick: onde uma guanina está presente em um molde, um desoxinucleotídeo da citosina é adicionado à nova fita, e assim por diante. Essa foi uma descoberta particularmente importante, não apenas porque forneceu uma base química para a precisa replicação de DNA semi-conservativa, mas também porque representou o primeiro exemplo da utilização de um molde como guia para uma reação biossintética.

Em segundo lugar, as polimerases precisam de um **primer** (iniciador). Um iniciador é um segmento de fita (complementar ao molde) com um grupo 3'-hidroxila livre, ao qual um nucleotídeo pode ser adicionado; a extremidade 3' livre do iniciador é chamada de **terminal do iniciador**. Em outras palavras, parte dessa nova fita já deve estar no lugar: todas as DNA-polimerases só podem adicionar nucleotídeos a uma fita preexistente. Muitos iniciadores são oligonucleotídeos de RNA, em vez de DNA, e enzimas especializadas sintetizam iniciadores quando e onde são necessários.

O sítio ativo de uma DNA-polimerase tem duas partes (Figura 25-5b). O nucleotídeo que chega é inicialmente posicionado no **sítio de inserção**. Uma vez que a ligação fosfodiéster é formada, a polimerase desliza para a frente no DNA, e o novo par de bases é posicionado no **sítio de pós-inserção**. Esses elementos estão localizados em um bolso que se assemelha à palma de uma mão (Figura 25-5c).

Após a adição de um nucleotídeo em uma fita de DNA em crescimento, uma DNA-polimerase pode tanto se dissociar como se mover ao longo do molde e adicionar outro nucleotídeo. A dissociação e a reassociação da polimerase podem limitar a velocidade de polimerização geral – o processo é geralmente mais rápido quando uma polimerase adiciona mais nucleotídeos sem se dissociar do molde. O número médio de nucleotídeos adicionados antes da dissociação de uma polimerase define sua **processividade**. DNA-polimerases variam muito em processividade; algumas adicionam apenas alguns poucos nucleotídeos antes de sua dissociação, outras adicionam muitos milhares.

A replicação tem alto grau de precisão

A replicação prossegue com extraordinário grau de fidelidade. Em *E. coli*, um erro acontece apenas a cada 10^9 a 10^{10} nucleotídeos adicionados. Para o cromossomo de *E. coli* de aproximadamente $4,6 \times 10^6$ pb, isso significa que um erro ocorre apenas uma vez por 1.000 a 10.000 replicações. Durante a polimerização, a diferenciação entre nucleotídeos corretos e incorretos depende não apenas das ligações de hidrogênio que especificam o pareamento correto entre bases complementares, mas também da geometria comum dos pares de bases padrão A=T e G=C (**Figura 25-6**). O sítio ativo da DNA-polimerase I acomoda apenas pares de bases com essa geometria. Um nucleotídeo incorreto pode ser capaz de fazer uma ligação de hidrogênio com uma base no molde, mas ele geralmente não se encaixará no sítio ativo.

Bases incorretas podem ser rejeitadas antes que a ligação fosfodiéster seja formada.

A precisão da reação de polimerização em si, no entanto, é insuficiente para explicar o alto grau de fidelidade na replicação. Medições cuidadosas *in vitro* mostraram que as DNA-polimerases inserem um nucleotídeo incorreto para cada 10^4 a 10^5 inserções corretas. Esses erros algumas vezes ocorrem porque uma base está brevemente em uma forma tautomérica incomum (ver Figura 8-9), permitindo que se ligue por ligação de hidrogênio com um parceiro incorreto. *In vivo*, a taxa de erro é reduzida por mecanismos enzimáticos adicionais.

Um mecanismo intrínseco de muitas DNA-polimerases é uma atividade separada de exonuclease $3' \rightarrow 5'$ que verifica cada nucleotídeo após sua adição. Essa atividade nucleásica permite a remoção pela enzima de um nucleotídeo adicionado recentemente e é altamente específica para pares de bases malpareados (**Figura 25-7**). Se a polimerase adicionou o nucleotídeo errado, a translocação da enzima para a posição onde o próximo nucleotídeo seria adicionado é inibida. Essa pausa cinética fornece a oportunidade para uma correção. A atividade exonucleásica $3' \rightarrow 5'$ remove o nucleotídeo malpareado, e a polimerase inicia novamente. Essa atividade, conhecida como **revisão**, não é simplesmente o inverso da reação de polimerização (Equação 25-1), uma vez que o pirofosfato não está envolvido. As atividades de polimerização e revisão de uma DNA-polimerase podem ser medidas separadamente. A revisão aperfeiçoa a precisão inerente

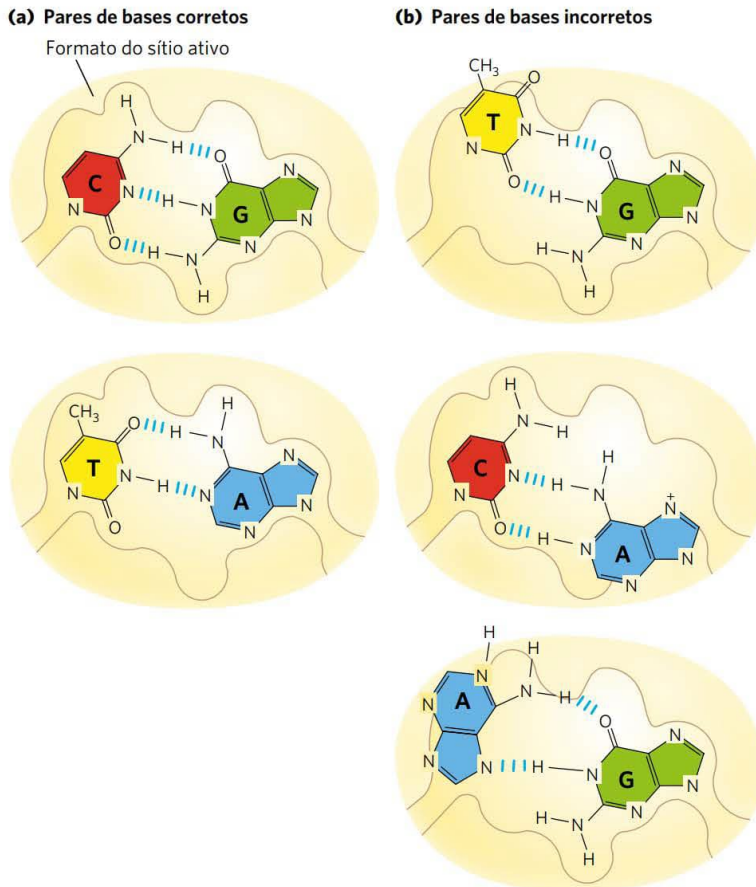


FIGURA 25-6 Contribuição da geometria de pares de bases para a fidelidade da replicação do DNA. **(a)** Os pares de bases padrão A=T e G=C têm geometrias muito semelhantes e um sítio ativo com tamanho adequado para acomodá-los, em geral, acomodará o outro. **(b)** A geometria das bases pareadas incorretamente pode excluí-las do sítio ativo, como ocorre na DNA-polimerase.

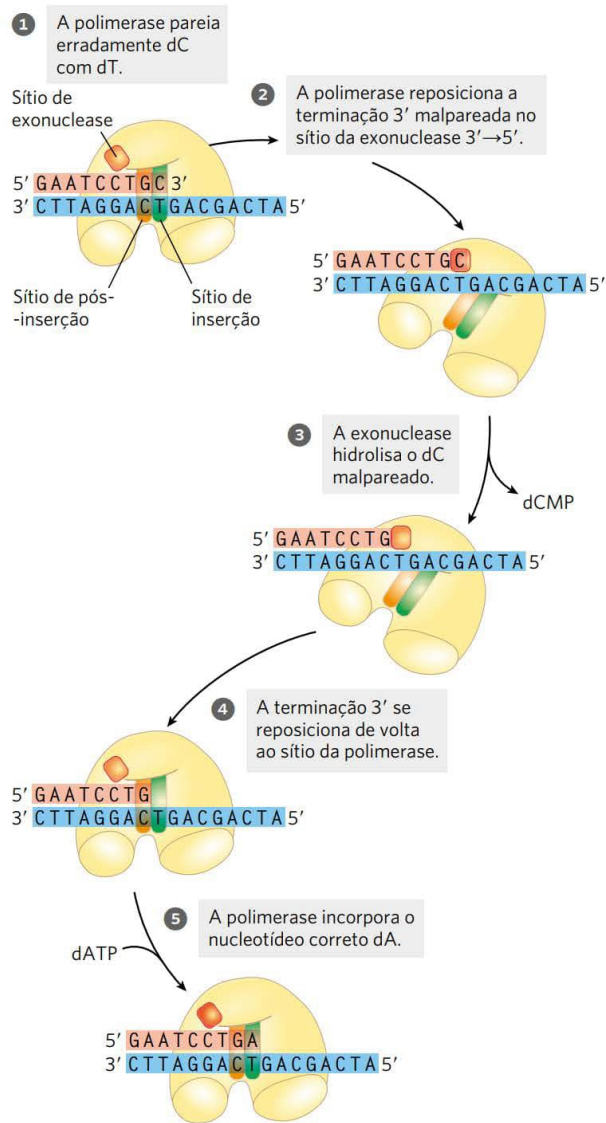


FIGURA 25-7 Exemplo de correção de erro pela atividade exonucleásica 3'→5' da DNA-polimerase I. A análise estrutural localizou a atividade de exonuclease atrás da atividade de polimerase, uma vez que a enzima é orientada em seu movimento ao longo do DNA. Uma base malpareada (aqui, um malpareamento C–T) impede a translocação da DNA-polimerase I (Pol I) para o próximo sítio. O DNA ligado à enzima desliza para trás, para o sítio da exonuclease, e a enzima corrige o erro com sua atividade exonucleásica 3'→5'. A enzima, então, reassume sua atividade polimerásica na direção 5'→3'.

da reação de polimerização em 10^2 a 10^3 vezes. Na DNA-polimerase I monomérica, as atividades de polimerização e revisão possuem sítios ativos separados no interior do mesmo polipeptídeo.

Quando a seleção de bases e a revisão são combinadas, a DNA-polimerase deixa para trás um erro resultante para cada 10^6 a 10^8 bases adicionadas. No entanto, a precisão medida em *E. coli* é ainda maior. A precisão adicional é fornecida por um sistema enzimático separado que repara o pareamento de bases malpareado que permaneceu após a

replicação. Esse reparo de malpareamento é descrito, junto com outros processos de reparo do DNA, na Seção 25.2.

E. coli tem pelo menos cinco DNA-polimerases

Mais de 90% da atividade de DNA-polimerase observada em extratos de *E. coli* pode ser explicada pela DNA-polimerase I. Entretanto, logo após o isolamento dessa enzima, em 1955, foram acumuladas evidências de que ela não era adequada para o grande cromossomo de *E. coli*. Em primeiro lugar, a taxa com que ela adiciona nucleotídeos (600 nucleotídeos/min) é muito lenta (por um fator de 100 ou mais) para explicar a velocidade em que a forquilha de replicação se move na célula bacteriana. Em segundo lugar, a DNA-polimerase I tem uma processividade relativamente lenta. Em terceiro lugar, estudos genéticos demonstraram que muitos genes e, portanto, muitas proteínas, estão envolvidos na replicação: a DNA-polimerase I claramente não age sozinha. Em quarto lugar, e o mais importante, em 1969, John Cairns isolou uma linhagem bacteriana com um gene alterado para a DNA-polimerase I que produziu uma enzima inativa. Embora essa linhagem fosse anormalmente sensível aos agentes que danificaram DNA, ela era, contudo, viável.

Uma busca por outras DNA-polimerases levou à descoberta da **DNA-polimerase II** e da **DNA-polimerase III** de *E. coli* no início da década de 1970. A DNA-polimerase II é uma enzima envolvida em um tipo de reparo do DNA (Seção 25.3). A DNA-polimerase III é a principal enzima de replicação em *E. coli*. As DNA-polimerases IV e V, identificadas em 1999, estão envolvidas em uma forma incomum de reparo do DNA (Seção 25.2). As propriedades dessas três DNA-polimerases são comparadas na Tabela 25-1.

A DNA-polimerase I, portanto, não é a enzima principal da replicação; em vez disso, ela executa funções de limpeza durante a replicação, recombinação e reparo. As funções especiais das polimerases são potencializadas pela sua atividade exonucleásica 5'→3'. Essa atividade, diferentemente da atividade nucleásica de revisão 3'→5' (Figura 25-7), está localizada no domínio estrutural que pode ser separado do resto da enzima por tratamento moderado com protease. Quando o domínio de exonuclease 5'→3' é removido, o fragmento remanescente (M_r 68.000), o **fragmento grande** ou **fragmento Klenow**, mantém as atividades de polimerização e de revisão. A atividade de exonuclease 5'→3' da DNA-polimerase I intacta pode substituir um segmento de DNA (ou RNA) pareado com a fita-molde, em um processo conhecido como tradução de corte (*nick translation*) (Figura 25-8). A maioria das outras DNA-polimerases não tem a atividade de exonuclease 5'→3'.

A DNA-polimerase III é muito mais complexa do que a DNA-polimerase I, com nove tipos diferentes de subunidades (Tabela 25-2). Suas atividades de polimerização e revisão estão nas subunidades α e ϵ (épsilon), respectivamente. A subunidade θ se associa com α e ϵ para formar uma polimerase central, a qual pode polimerizar DNA, mas com processividade limitada. Até três polimerases centrais podem ser ligadas por outro conjunto de subunidades, um complexo de carregamento de braçadeiras, consistindo de cinco subunidades de três tipos diferentes, $\tau_3\delta\delta'$. As polimerases centrais estão ligadas através das subunidades τ (tau). Duas subunidades adicionais, χ (chi) e ψ (psi), estão ligadas

TABELA 25-1 Comparação de cinco DNA-polimerases de *E. coli*

	DNA-polimerase				
	I	II ^a	III	IV ^a	V ^a
Genes estruturais ^b	<i>polA</i>	<i>polB</i>	<i>polC (dnaE)</i>	<i>dinB</i>	<i>umuC</i>
Subunidades (número de tipos diferentes)	1	7	9	1	3
M_r	103.000	88.000 ^c	1.065.400	39.100	110.000
Exonuclease 3'→5' (revisora)	Sim	Sim	Sim	Não	Não
Exonuclease 5'→3'	Sim	Não	Não	Não	Não
Velocidade de polimerização (nucleotídeos/s)	10-20	40	250-1.000	2-3	1
Processividade (nucleotídeos adicionados antes que a polimerase se dissocie)	3-200	1.500	≥ 500.000	1	6-8

^aDNA-polimerases transgênicas (mutagênicas). Para a DNA-polimerase IV, a processividade está substancialmente aumentada pela associação com a braçadeira β . Essas polimerases são desaceleradas quando uma lesão no DNA está presente na fita-molde do DNA.

^bPara enzimas com mais de uma subunidade, o gene listado aqui codifica a subunidade com atividade de polimerização. Observe que *dnaE* é uma designação anterior para o gene agora chamado de *polC*.

^cSubunidade de polimerização apenas. A DNA-polimerase II compartilha várias subunidades com a DNA-polimerase III, incluindo as subunidades β , δ , δ' , χ e ψ (ver Tabela 25-2).

ao complexo de carregamento de braçadeiras. O conjunto completo de 16 subunidades de proteínas (nove tipos diferentes) é chamado de DNA-polimerase III* (**Figura 25-9a**).

A DNA-polimerase III* pode polimerizar o DNA, mas com uma processividade muito menor do que seria de se esperar para a replicação organizada de um cromossomo inteiro. O aumento necessário na processividade é fornecido pela adição de subunidade β . As subunidades β associam-se

em pares para formar estruturas com formato de *donut* que cercam o DNA e agem como grampos (Figura 25-9b). Cada dímero se associa com um subconjunto central da polimerase III* (uma braçadeira dimérica para cada subconjunto central) e desliza ao longo do DNA à medida que a replicação prossegue. A braçadeira β deslizante evita a dissociação da DNA-polimerase III do DNA, aumentando drasticamente a processividade – mais de 500.000 vezes (Tabela 25-1). A adição de subunidades β convertem DNA-polimerase III* em DNA-polimerase III holoenzima.

A replicação do DNA precisa de muitas enzimas e fatores proteicos

A replicação em *E. coli* não precisa apenas de uma única DNA-polimerase, mas de 20 ou mais enzimas e proteínas diferentes, cada uma realizando uma tarefa específica. O complexo inteiro foi denominado **sistema de DNA-replicase** ou **replissomo**. A complexidade enzimática da replicação reflete as limitações impostas pela estrutura do DNA e pelas necessidades de precisão. As principais classes de enzimas de replicação são consideradas aqui em termos de problemas por elas superados.

FIGURA 25-8 Tradução de corte. A DNA-polimerase bacteriana tem três domínios, catalisando suas atividades de DNA-polimerase, exonuclease 5'→3' e exonuclease 3'→5'. O domínio de exonuclease 5'→3' está na frente da enzima à medida que ela se desloca ao longo do DNA, não mostrado na Figura 25-5. Ao degradar a fita de DNA à frente da enzima e sintetizar uma nova fita atrás, a DNA-polimerase I pode promover uma reação chamada de tradução de corte (*nick translation*), em que uma quebra ou corte no DNA é efetivamente movido ao longo da molécula com a enzima. Esse processo tem um papel no reparo de DNA e na remoção dos iniciadores de RNA durante a replicação (ambos descritos posteriormente). A fita de ácido nucleico a ser removida (seja DNA ou RNA) é mostrada em roxo, a fita de substituição, em vermelho. A síntese de DNA inicia em um corte (uma ligação fosfodiéster quebrada, deixando uma hidroxila 3' livre e um fosfato 5' livre). Um corte permanece onde a DNA-polimerase, por fim, dissocia-se, sendo mais tarde selado por outra enzima.

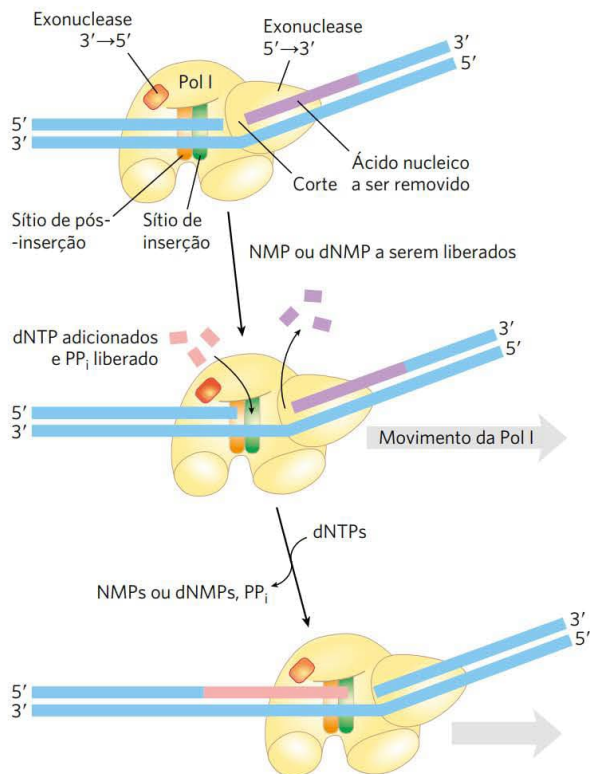


TABELA 25-2 Subunidades da DNA-polimerase III de *E. coli*

Subunidade	Número de subunidades por holoenzima	M_r da subunidade	Gene	Função da subunidade	
α	3	129.900	<i>polC (dnaE)</i>	Atividade de polimerização	Núcleo da polimerase
ε	3	27.500	<i>dnaQ (mutD)</i>	Exonuclease de revisão 3'→5'	
θ	3	8.600	<i>holE</i>	Estabilização da subunidade ε	
τ	3	71.100	<i>dnaX</i>	Ligação ao molde estável; dimerização do núcleo enzimático	Complexo carreador de braçadeiras (β) que carrega as subunidades γ na fita tardia de cada fragmento de Okazaki ^a
δ	1	38.700	<i>holA</i>	Abridor de braçadeira	
δ'	1	36.900	<i>holB</i>	Carregadora de braçadeira	
χ	1	16.600	<i>holC</i>	Interação com SSB	
ψ	1	15.200	<i>holD</i>	Interação com τ e χ	
β	6	40.600	<i>dnaN</i>	Grampo de DNA necessário para processividade ótima	

^aO complexo carreador de braçadeiras é também chamado de complexo γ , devido à existência de uma outra versão do complexo em que três subunidades denominadas γ substituem as subunidades τ . A subunidade γ é codificada por uma porção do gene para a subunidade τ (*dnaX*), de forma que 66% da porção aminoterminal da subunidade τ têm a mesma sequência de aminoácidos da subunidade γ . A subunidade γ é produzida por um mecanismo de tradução por mudança de fase de leitura (p. 1085) que leva à terminação prematura da tradução. A subunidade γ compartilha as funções de carreador de braçadeira de τ , mas não possui os segmentos de proteína que interagem com a polimerase central ou com a helicase DnaB. Os complexos de carreadores de braçadeira incorporando subunidades γ podem operar independentemente da holoenzima DNA-polimerase III, promovendo a descarga de grampos β descartados na fita tardia à medida que a forquilha de replicação progride. Eles também podem promover o carregamento de grampos β para alguns processos de reparo de DNA que precisam de síntese de DNA longe da forquilha de replicação.

O acesso às fitas de DNA que atuam como moldes requer a separação das duas fitas parentais. Isso geralmente é conseguido pelas **helicases**, enzimas que se deslocam ao longo do DNA e separam suas fitas, utilizando energia química a partir do ATP. A separação das fitas cria um estresse topológico na estrutura helicoidal do DNA (ver Figura 24-11), que

é aliviado pela ação de **topoisomerases**. As fitas separadas são estabilizadas por **proteínas de ligação de DNA**. Como observado anteriormente, antes de as DNA-polimerases poderem começar a sintetizar DNA, iniciadores devem estar presentes no molde – geralmente, pequenos segmentos de RNA sintetizados por enzimas conhecidas como **primases**.

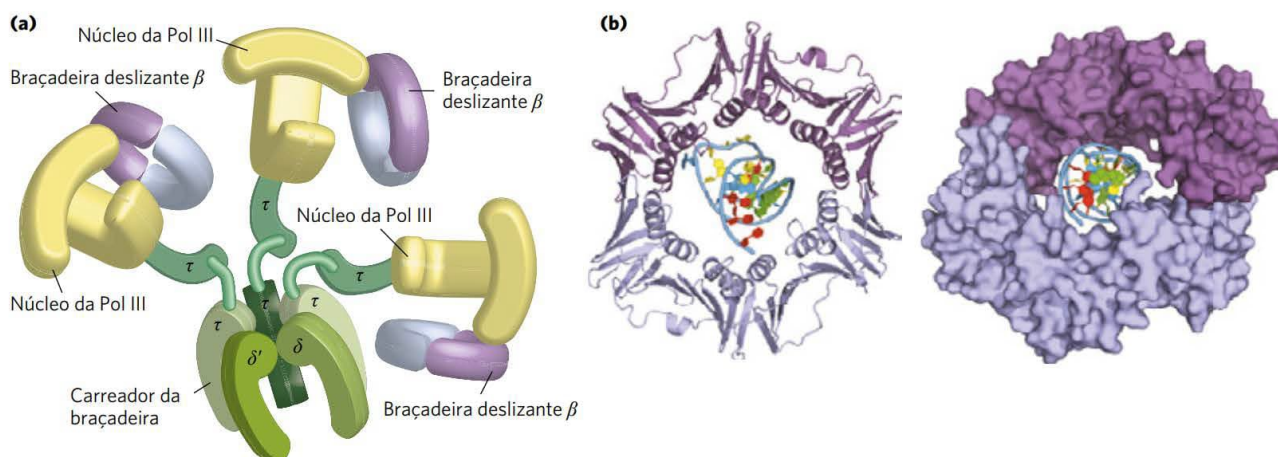


FIGURA 25-9 DNA-polimerase III. (a) Arquitetura da DNA-polimerase III bacteriana (Pol III). Três domínios centrais, compostos pelas subunidades α , ε e θ , estão ligados pelo complexo de carregamento de braçadeira de cinco subunidades (também conhecido como complexo γ ; a explicação do nome está no rodapé da Tabela 25-2) com a composição $\tau_3\delta\delta'$. As subunidades centrais e o complexo carreador de braçadeiras constituem a DNA-polimerase III*. As outras duas subunidades da DNA-polimerase III*, χ e ψ (não mostradas), também se ligam ao complexo de carregamento de braçadeira. Três grampos β interagem com os três subconjuntos centrais, cada grampo um dímero da subunidade β . O complexo interage com a helicase DnaB (descrita mais tarde neste texto) através das subunidades τ . (b) As duas subunidades β da polimerase III da *E. coli* formam uma braçadeira circular que envolve o DNA. A braçadeira desliza ao longo da molécula de DNA, aumentando a processividade da holoenzima da polimerase III para mais de 500 mil nucleotídeos ao impedir sua dissociação do DNA. As duas subunidades β são mostradas em duas tonalidades de roxo como estruturas em fita (à esquerda) e imagens de superfície (à direita), envolvendo o DNA. [Fontes: (a) informação de N. Yao e M. O'Donnell, *Mol. Biosyst.* 4:1075, 2008. (b) PDB ID 2POL, X.-P. Kong et al., *Cell* 69:425, 1992.]

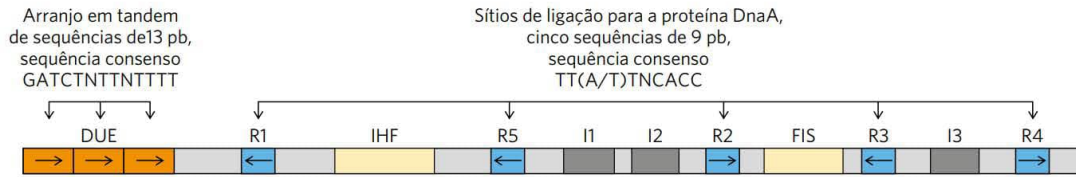


FIGURA 25-10 Arranjo das sequências na origem de replicação de *E. coli*, *oriC*. São mostradas sequências-consenso (p. 104) para elementos-chave repetitivos. N representa qualquer um dos quatro nucleotídeos. As setas horizontais indicam as orientações das sequências nucleotídicas (a seta da esquerda para a direita indica uma sequência na cadeia superior; da direita para a esquerda, na cadeia inferior). O FIS e o IHF são sítios de ligação para proteínas descritas no texto. Os sítios R são ligados pela DnaA. Os sítios I são sítios adicionais de ligação pela DnaA (com diferentes sequências), ligados pela DnaA apenas quando a proteína está complexada com ATP.

Em última análise, os iniciadores de RNA são removidos e substituídos por DNA; em *E. coli*, esta é uma das muitas funções da DNA-polimerase I. Uma nuclease especializada que degrada o RNA em híbridos de RNA-DNA, chamada de RNase H1, também remove alguns iniciadores de RNA. Depois que um iniciador de RNA é removido e o intervalo é preenchido com DNA, um corte (*nick*) permanece no esqueleto do DNA na forma de uma ligação fosfodiéster rompida. Esses cortes são selados por **DNA-ligasas**. Todos esses processos necessitam de coordenação e regulação, uma ação combinada mais bem caracterizada no sistema de *E. coli*.

A replicação do cromossomo de *E. coli* prossegue em estágios

A síntese de uma molécula de DNA pode ser dividida em três estágios: iniciação, alongamento e terminação, diferenciando-se tanto pelas reações que ocorrem como pelas enzimas necessárias. Como você descobrirá aqui e nos dois capítulos seguintes, a síntese dos principais polímeros biológicos que contêm informação – DNA, RNA e proteínas – pode ser compreendida com base nesses mesmos três estágios, com os estágios de cada via apresentando características peculiares. Os eventos descritos a seguir refletem a

informação decorrente principalmente de experimentos *in vitro* utilizando proteínas purificadas de *E. coli*, embora os princípios sejam altamente conservados em todos os sistemas de replicação.

Iniciação A origem de replicação da *E. coli*, *oriC*, consiste em 245 pb e contém elementos sequenciais de DNA que são altamente conservados entre origens de replicação bacteriana. O arranjo geral das sequências conservadas é ilustrado na **Figura 25-10**. Dois tipos de sequências apresentam especial interesse: cinco repetições de uma sequência de 9 pb (sítios R) que funcionam como sítios de ligação para a proteína iniciadora chave, DnaA, e uma região rica em pares de bases A=T, chamada de **elemento de desenrolamento de DNA (DUE)**. Há três sítios de ligação de DnaA (sítios I), e sítios de ligação para proteínas IHF (fator de integração do hospedeiro) e FIS (fator para estimulação de inversão). Essas duas proteínas foram descobertas como componentes necessários por algumas reações de recombinação descritas adiante neste capítulo, e seus nomes refletem esses papéis. Outra proteína de ligação de DNA, a HU (proteína bacteriana semelhante à histona, originalmente denominada fator U), também participa, mas não tem um sítio de ligação específico.

TABELA 25-3 Proteínas necessárias para iniciar a replicação na origem de *E. coli*

Proteínas	M_r	Número de subunidades	Função
Proteína DnaA	52.000	1	Reconhece a sequência <i>oriC</i> ; abre a dupla-fita em sítios específicos na origem
Proteína DnaB (helicase)	300.000	6 ^a	Desenrola o DNA
Proteína DnaC	174.000	6 ^a	Necessária para a ligação da DnaB na origem
HU	19.000	2	Proteína semelhante à histona; proteína de ligação do DNA; estimula a iniciação
FIS	22.500	2 ^a	Proteína de ligação do DNA; estimula a iniciação
IHF	22.000	2	Proteína de ligação do DNA; estimula a iniciação
Primase (proteína DnaG)	60.000	1	Sintetiza iniciadores de RNA
Proteína de ligação ao DNA de fita simples (SSB)	75.600	4 ^a	Liga-se ao DNA de fita simples
DNA-girase (DNA-topoisomerase II)	400.000	4	Alivia a tensão de torção gerada pelo desenrolamento do DNA
Dam metilase	32.000	1	Metila as sequências (5')GATC em <i>oriC</i>

^aAs subunidades nesses casos são idênticas.

Pelo menos 10 enzimas ou proteínas diferentes (resumidas na Tabela 25-3) participam da fase de iniciação da replicação. Elas abrem a hélice de DNA na origem e estabelecem um complexo de pré-iniciação para reações subsequentes. O componente crucial no processo de iniciação é a proteína DnaA, um membro da família de proteínas **AAA+-ATPase** (ATPases associadas a diversas atividades celulares). Muitas AAA+ ATPases, incluindo a DnaA, formam oligômeros e hidrolisam ATP de forma lenta. Esta hidrólise de ATP atua como um interruptor, mediando a interconversão da proteína entre dois estados. No caso da DnaA, a forma ligada ao ATP é ativa, e a forma ligada ao ADP, inativa.

Oito moléculas da proteína DnaA, todas no estado ligadas ao ATP, reúnem-se para formar um complexo helicoidal abrangendo os sítios R e I no *oriC* (Figura 25-11). A DnaA tem maior afinidade pelos sítios R do que pelos sítios I e se liga aos sítios R com igual facilidade tanto na forma ligada ao ATP quanto na forma ligada ao ADP. Os sítios I, os quais se ligam apenas à DnaA ligada ao ATP, permitem a diferenciação entre as formas ativas e inativas de DnaA. O enrolamento estreito do DNA para a direita em volta desse complexo introduz um eficaz superenrolamento positivo (ver Capítulo 24). A tensão associada no DNA vizinho, combinada com a ligação de proteína DnaA adicional à região DUE, leva à desnaturação na região rica em A=T da DUE. O complexo formado na origem de replicação também inclui várias proteínas de ligação de DNA – HU, IHF e FIS – que facilitam o enovelamento do DNA.

A proteína DnaC, uma outra AAA+-ATPase, carrega então a proteína DnaB para as fitas de DNA separadas na região desnaturada. Um hexâmero de DnaC, cada subunidade ligada ao ATP, forma um complexo rígido com a helicase DnaB hexamérica e em forma de anel. Essa interação DnaC-DnaB abre o anel da DnaB, em um processo auxiliado por uma interação adicional entre a DnaB e a DnaA. Dois hexâmeros de DnaB em forma de anel são carregados no DUE, cada um em uma fita de DNA. O ATP ligado à DnaC é hidrolisado, liberando-a e deixando a DnaB ligada ao DNA.

O carregamento da helicase DnaB é a etapa-chave na iniciação da replicação. Como uma helicase replicativa, a DnaB migra ao longo da fita simples de DNA na direção 5'→3', desenrolando o DNA ao longo do caminho. As helicases DnaB carregadas nas duas fitas de DNA viajam em direções opostas, criando duas forquilha de replicação potenciais. Todas as outras proteínas na forquilha de replicação são ligadas direta ou indiretamente à DnaB. A holoenzima DNA-polimerase III está ligada através de suas subunidades τ ; interações adicionais de DnaB estão descritas a seguir. À medida que a replicação começa e as fitas de DNA são separadas na forquilha, muitas moléculas de proteínas de ligação de DNA de fita simples (SSB) se ligam e estabilizam as fitas separadas, e a DNA-girase (DNA-topoisomerase II) alivia o estresse topológico induzido à frente da forquilha pela reação de desenrolamento.

A iniciação é a única fase da replicação do DNA que é conhecida por ser regulada, e ela é regulada de modo que a replicação ocorra apenas uma vez em cada ciclo celular.

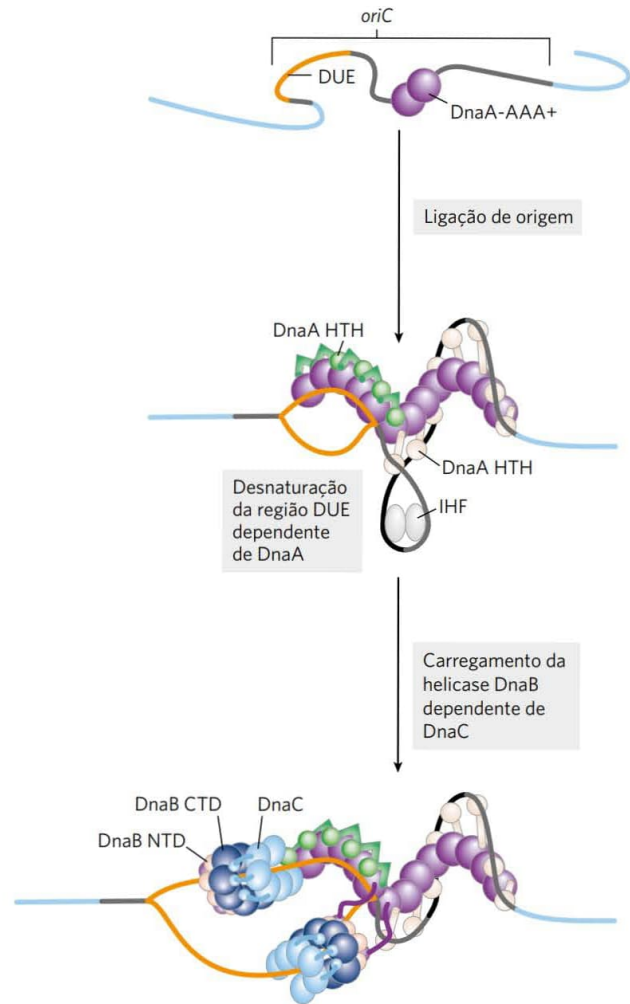


FIGURA 25-11 Modelo para iniciação da replicação na origem de *E. coli*, *oriC*. Oito moléculas da proteína DnaA, cada uma com um ATP ligado, ligam-se nos sítios R e I na origem (ver Figura 25-10). O DNA está enrolado em volta desse complexo, formando uma estrutura helicoidal orientada a direita, que continua na região do DUE. A região de DUE rica em A=T é desnaturada como resultado da tensão conferida pela ligação ao DnaA. A formação do complexo helicoidal de DnaA é facilitada pelas proteínas HU, IHF e FIS. Os papéis estruturais detalhados dessas proteínas não são conhecidos, mas a IHF pode estabilizar um laço de DNA transitório, como mostrado aqui. Hexâmeros da proteína DnaB se ligam a cada fita, com o auxílio da proteína DnaC. A atividade da helicase da DnaB desenrola o DNA na preparação para a síntese do iniciador e do DNA. [Fonte: informação de J. P. Erzberger et al., *Nature Struct. Mol. Biol.* 13:676, 2006.]

O mecanismo de regulação ainda não é completamente compreendido, mas estudos genéticos e bioquímicos forneceram informações sobre vários mecanismos regulatórios distintos.

Uma vez que a DNA-polimerase III tenha sido carregada na direção do DNA, em conjunto com as subunidades β (sinalizando a finalização da fase de iniciação), a proteína

Hda liga-se às subunidades β e interage com a DnaA para estimular a hidrólise de seu ATP ligado. A Hda é mais outra AAA+-ATPase intimamente relacionada à DnaA (seu nome é derivado de homólogo à DnaA). Essa hidrólise do ATP leva à desmontagem do complexo de DnaA na origem. A liberação lenta do ADP pela DnaA e a religação do ATP faz a proteína circular entre suas formas inativa (ligada a ADP) e ativa (ligada a ATP) em uma escala de tempo de 20 a 40 minutos.

O tempo de iniciação da replicação é afetado pela metilação do DNA e pelas interações com a membrana plasmática bacteriana. O DNA *oriC* é metilado pela Dam metilase (Tabela 25-3), a qual metila a posição N⁶ da adenina no interior da sequência palindrômica (5')GATC. (Dam significa metilação da adenina do DNA; do inglês, *DNA adenine methylation*). A região *oriC* de *E. coli* é muito rica em sequências GATC – ela possui 11 em seus 245 pb, ao passo que a frequência média de GATC no cromossomo de *E. coli*, como um todo, é de 1 em cada 256 pb.

Imediatamente após a replicação, o DNA é hemimetilado: as fitas parentais têm sequências *oriC* metiladas, mas as fitas recém-sintetizadas, não. As sequências *oriC* hemimetiladas são agora sequestradas pela interação com a membrana plasmática (o mecanismo é desconhecido) e pela ligação da proteína SeqA. Após um tempo, a *oriC* é liberada da membrana plasmática, dissocia-se de SeqA e o DNA deve estar totalmente metilado pela Dam metilase antes que ele possa novamente se ligar à DnaA e iniciar um novo ciclo de replicação.

Alongamento A fase de alongamento da replicação inclui duas operações distintas, porém relacionadas: a síntese da fita-líder e a síntese da fita tardia. Várias enzimas na forquilha de replicação são importantes para a síntese de ambas as fitas. O DNA parental é inicialmente desenrolado pelas DNA-helicases, e o estresse topológico resultante é aliviado pelas topoisomerases. Cada fita separada é, então, estabilizada pela SSB. A partir desse ponto, a síntese das fitas líder e tardia é completamente diferente.

A síntese da fita-líder, a mais direta das duas, começa com a síntese pela primase (proteína DnaG) de um iniciador curto de RNA (10 a 60 nucleotídeos) na origem de replicação. A DnaG interage com a helicase DnaB para realizar essa reação, e o iniciador é sintetizado na direção oposta àquela em que a helicase DnaB está se movendo. Na verdade, a helicase DnaB move-se ao longo da fita que se torna a fita tardia na síntese do DNA; entretanto, o primeiro iniciador formado na primeira interação DnaG-DnaB funciona como iniciador da síntese da fita-líder de DNA na direção oposta. Desoxirribonucleotídeos são adicionados a esse iniciador por um complexo DNA-polimerase III ligado à helicase DnaB presa à fita de DNA oposta. A síntese da fita-líder prossegue então continuamente, acompanhando o desenrolamento do DNA na forquilha de replicação.

A síntese da fita tardia, como já foi observado, é realizada em fragmentos curtos de Okazaki (**Figura 25-12a**). Inicialmente, um iniciador de RNA é sintetizado pela primase e, como na síntese da fita-líder, a DNA-polimerase III liga-

-se ao iniciador de RNA e adiciona desoxirribonucleotídeos (**Figura 25-12b**). Nesse nível, a síntese de cada fragmento de Okazaki parece ser direta, porém a realidade é muito complexa. A complexidade reside na *coordenação* da síntese das fitas líder e tardia. Ambas as fitas são produzidas por um *único* dímero assimétrico de DNA-polimerase III; isso é conseguido fazendo uma volta na fita tardia de DNA, como mostrado na **Figura 25-13**, que coloca juntos os dois pontos de polimerização.

A síntese dos fragmentos de Okazaki na fita tardia implica uma coreografia enzimática elegante. A helicase DnaB e a primase DnaG constituem uma unidade funcional no interior do complexo de replicação, o **primossomo**. A DNA-polimerase III utiliza um conjunto de suas subunidades centrais (a polimerase central) para sintetizar a fita-líder continuamente, ao passo que o outro conjunto de subunidades centrais realiza o ciclo de um fragmento de Okazaki para o próximo na fita tardia em alça. *In vitro*, uma holoenzima DNA-polimerase III com apenas dois conjuntos de subunidades centrais pode sintetizar as fitas líder e tardia. No entanto, um terceiro conjunto de subunidades nucleares aumenta a eficiência da síntese das fitas tardias, bem como a processividade global do replissomo.

A helicase DnaB, ligada na frente da DNA-polimerase III, desenrola o DNA na forquilha de replicação (**Figura 25-13a**) à medida que ele viaja ao longo do molde da fita tardia na direção 5'→3'. A primase DnaG ocasionalmente se associa à helicase DnaB e sintetiza um iniciador de RNA curto (**Figura 25-13b**). Uma nova braçadeira β deslizante é, então, posicionada no iniciador pelo complexo carreador de braçadeiras da DNA-polimerase III (**Figura 25-13c**). Quando a síntese de um fragmento de Okazaki se completa, a replicação para e as subunidades centrais de DNA-polimerase III se dissociam de sua braçadeira β deslizante (e do fragmento completo de Okazaki) e se associam à nova braçadeira (**Figura 25-13d, e**). Isso inicia a síntese de um novo fragmento de Okazaki. Dois conjuntos de subunidades centrais podem estar envolvidos na síntese de dois fragmentos de Okazaki diferentes ao mesmo tempo. As proteínas que atuam na forquilha de replicação são resumidas na Tabela 25-4.

O complexo de carregamento de braçadeiras da DNA-polimerase III, que consiste em partes de três subunidades τ ao longo das subunidades δ e δ' , é também uma AAA+-ATPase. Esse complexo se liga ao ATP e à nova braçadeira β deslizante. A ligação confere tensão à braçadeira dimerica, abrindo o anel em uma subunidade da interface (**Figura 25-14**). A fita tardia que acabou de sofrer iniciação desliza para o interior do anel pela quebra resultante. O carreador de braçadeiras, então, hidrolisa o ATP, liberando a braçadeira β deslizante e permitindo que ela se feche em volta do DNA.

O replissomo promove síntese de DNA rápida, adicionando aproximadamente 1.000 a 2.000 nucleotídeos/s para cada fita (líder e tardia). Uma vez que um fragmento de Okazaki está completo, seu iniciador de RNA é removido pela DNA-polimerase I ou pela RNase H1 e substituído por DNA pela polimerase; o corte remanescente é selado pela DNA-ligase (**Figura 25-15**).

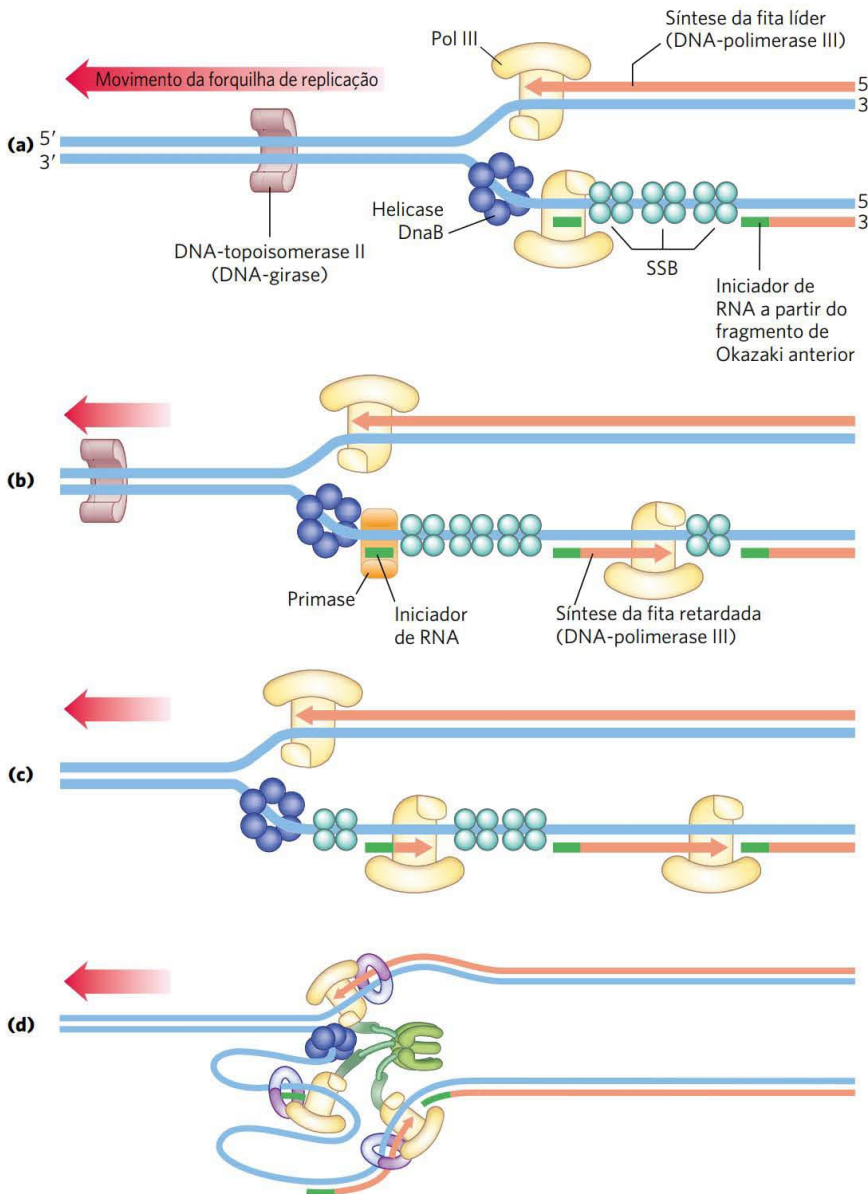


FIGURA 25-12 Síntese dos fragmentos de Okazaki. (a) A primase sintetiza, em intervalos, um iniciador de RNA para um novo fragmento de Okazaki. Observe que, ao se considerar as duas fitas-molde dispostas lado a lado, a síntese da fita tardia formalmente prossegue na direção oposta do movimento da forquilha. (b) Cada iniciador é estendido pela DNA-polimerase III. (c) A síntese de DNA continua até que o fragmento se estenda até o iniciador do fragmento de Okazaki previamente adicionado. Um novo iniciador é sintetizado próximo da forquilha de replicação para começar o processo novamente. (d) Cada holoenzima da DNA-polimerase III tem três conjuntos de subunidades centrais, de modo que um ou dois fragmentos de Okazaki podem ser sintetizados simultaneamente, junto com a fita-líder.

TABELA 25-4 Proteínas do replissomo de *E. coli*

Proteínas	M_r	Número de subunidades	Função
SSB	75.600	4	Ligação a um DNA de fita simples
Proteína DnaB (helicase)	300.000	6	Desenrolamento do DNA, constituinte do primossomo
Primase (proteína DnaG)	60.000	1	Síntese do iniciador de RNA; constituinte do primossomo
DNA-polimerase III	1.065.400	17	Novo alongamento da fita
DNA-polimerase I	103.000	1	Preenchimento dos intervalos; excisão dos iniciadores
DNA-ligase	74.000	1	Ligação
DNA-girase (DNA-topoisomerase II)	400.000	4	Superenrolamento

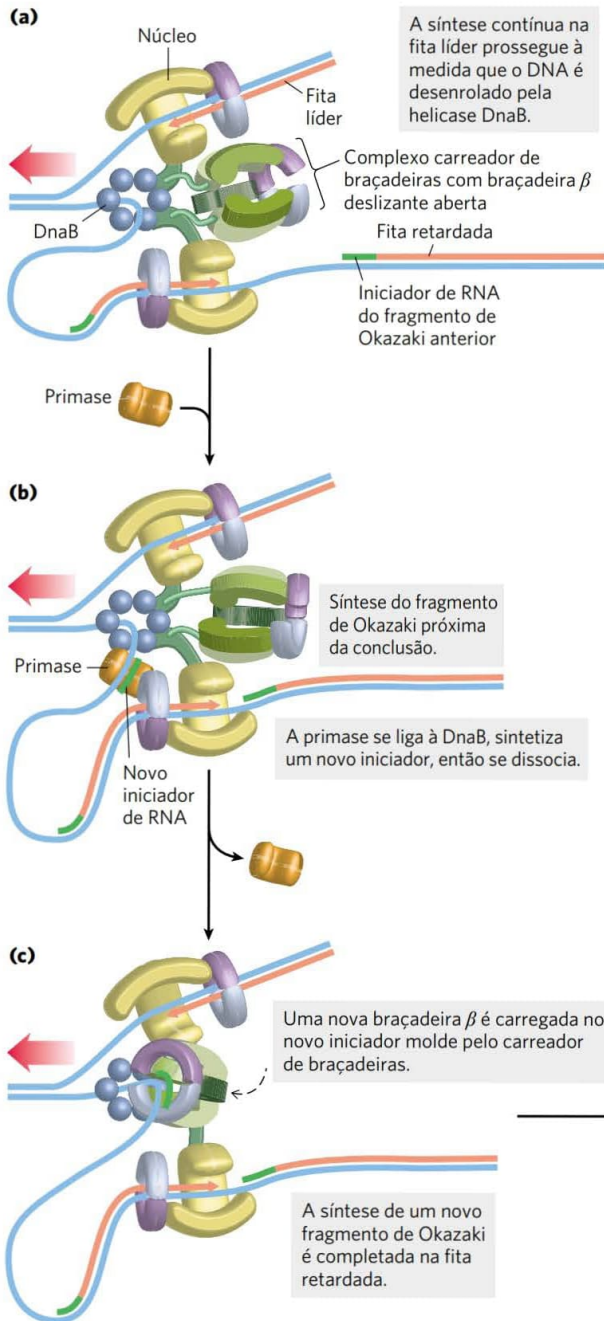


FIGURA 25-13 Síntese do DNA nas fitas líder e tardia. Os eventos na forquilha de replicação são coordenados por um dímero de uma única DNA-polimerase III, em um complexo integrado com a helicase DnaB. Esta figura mostra o processo de replicação ainda em curso; partes **(a)** até **(e)** são discutidas no texto. Apenas dois conjuntos de subunidades do núcleo da polimerase são mostrados, a fim de ilustrar claramente a ciclagem da fita tardia. A fita tardia sofre uma volta, de modo que a síntese de DNA prossegue constantemente tanto na fita-molde líder quanto na tardia ao mesmo tempo. As setas vermelhas indicam a extremidade 3' das duas novas fitas e a direção da síntese de DNA. Um fragmento de Okazaki está sendo sintetizado na fita tardia. As cores das subunidades e as funções do complexo carreador de braçadeiras são explicadas na Figura 25-14.

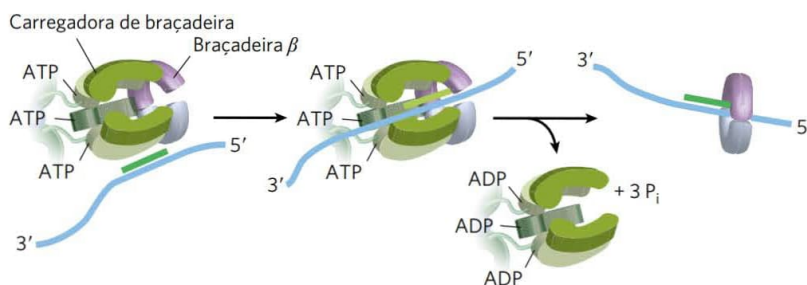


FIGURA 25-14 Carreador de braçadeiras da DNA-polimerase III. As cinco subunidades do complexo carreador de braçadeiras (γ) são as subunidades δ e δ' e o domínio aminoterminal de cada uma das três subunidades τ (ver Figura 25-9). O complexo liga-se a três moléculas de ATP e a uma braçadeira dimérica β . Esta ligação força a braçadeira β a se abrir em uma das suas duas interfaces de subunidade. A hidrólise do ATP ligado permite que a braçadeira β se feche de novo em torno do DNA.

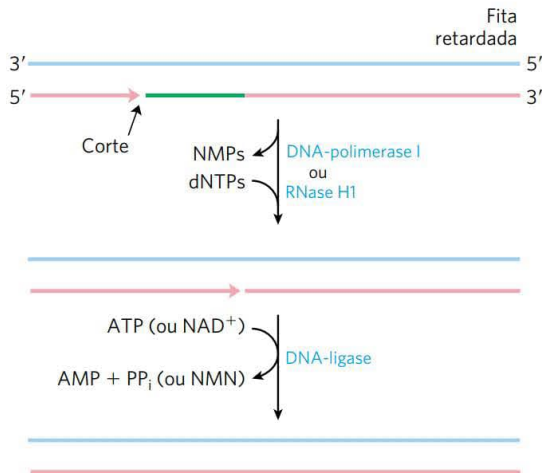


FIGURA 25-15 Etapas finais na síntese dos segmentos da fita tardia. Os iniciadores de RNA na fita-líder são removidos pela atividade exonucleásica 5'→3' da DNA-polimerase I ou RNase H1, e então substituído por DNA pela DNA-polimerase I. O corte remanescente é selado pela DNA-ligase. O papel do ATP ou do NAD^+ é mostrado na Figura 25-16.

A DNA-ligase catalisa a formação de uma ligação fosfodiéster entre 3'-hidroxila na extremidade de uma fita de DNA e 5'-fosfato na extremidade da outra fita. O fosfato deve ser ativado por adenilação. As DNA-ligasas isoladas

de vírus e eucariotos utilizam ATP para esse propósito. As DNA-ligasas de bactérias são incomuns pelo fato de muitas usarem NAD^+ – um cofator que geralmente funciona em reações de transferência de híbridos (ver Figura 13-24) – como a fonte do grupo de ativação de AMP (**Figura 25-16**). A DNA-ligase é outra enzima do metabolismo de DNA que se tornou um importante reagente em experimentos de DNA recombinante (ver Figura 9-1).

Terminação Por fim, as duas forquilha de replicação do cromossomo circular de *E. coli* se encontram em uma região terminal que contém cópias múltiplas de uma sequência de 20 pb, denominada Ter (**Figura 25-17**). As sequências Ter estão organizadas no cromossomo de forma a criar uma armadilha na qual a forquilha de replicação possa entrar, mas não sair. As sequências Ter funcionam como sítios de ligação para a proteína Tus (substância de utilização de término). O complexo Tus-Ter pode sequestrar uma forquilha de replicação a partir de apenas uma direção. Apenas um complexo Tus-Ter funciona por ciclo de replicação – o primeiro complexo encontrado por qualquer forquilha de replicação. Uma vez que as forquilha de replicação opostas geralmente param quando colidem, as sequências Ter não parecem ser essenciais, mas elas podem evitar o excesso de replicação por uma forquilha no evento no qual a outra está atrasada ou interrompida por um encontro com um dano no DNA ou algum outro obstáculo.

Assim, quando qualquer uma das forquilha de replicação encontra um complexo Tus-Ter funcional, ela para; a

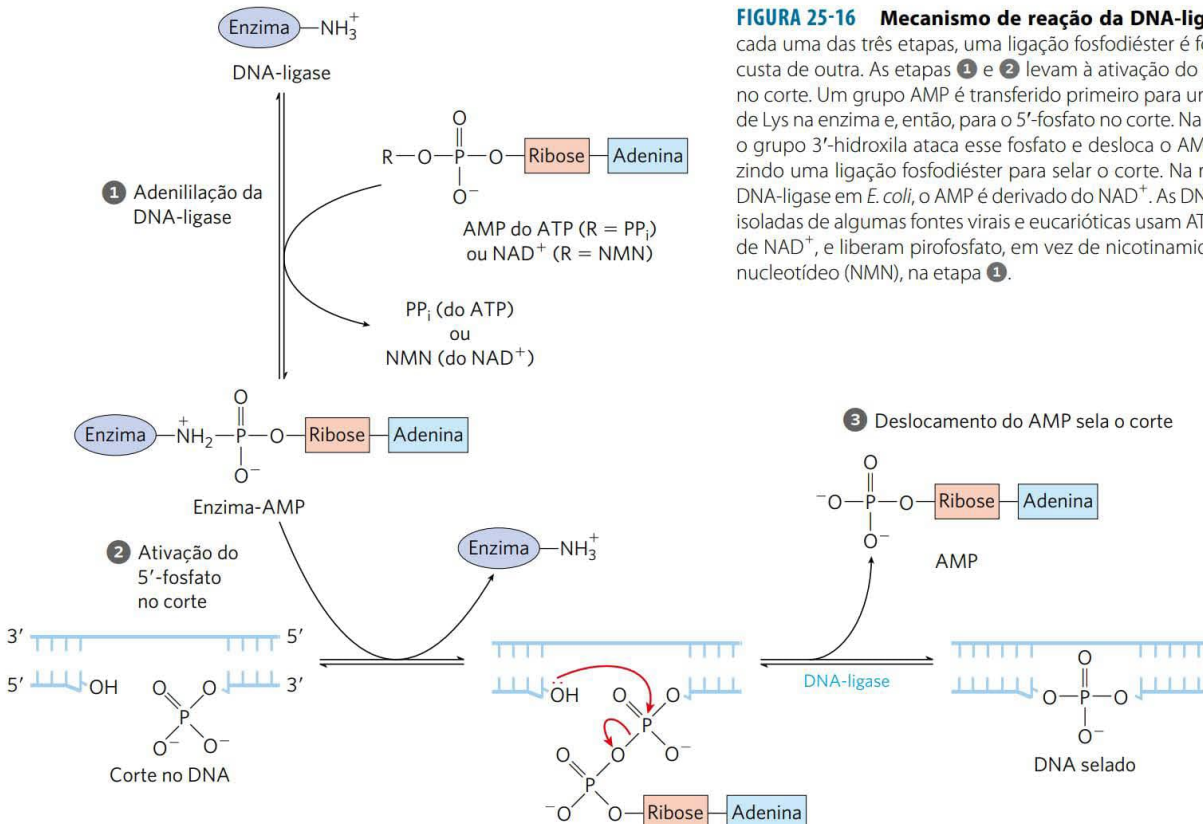


FIGURA 25-16 Mecanismo de reação da DNA-ligase. Em cada uma das três etapas, uma ligação fosfodiéster é formada à custa de outra. As etapas 1 e 2 levam à ativação do 5'-fosfato no corte. Um grupo AMP é transferido primeiro para um resíduo de Lys na enzima e, então, para o 5'-fosfato no corte. Na etapa 3, o grupo 3'-hidroxila ataca esse fosfato e desloca o AMP, produzindo uma ligação fosfodiéster para selar o corte. Na reação da DNA-ligase em *E. coli*, o AMP é derivado do NAD^+ . As DNA-ligasas isoladas de algumas fontes virais e eucarióticas usam ATP, em vez de NAD^+ , e liberam pirofosfato, em vez de nicotinamida mononucleotídeo (NMN), na etapa 1.

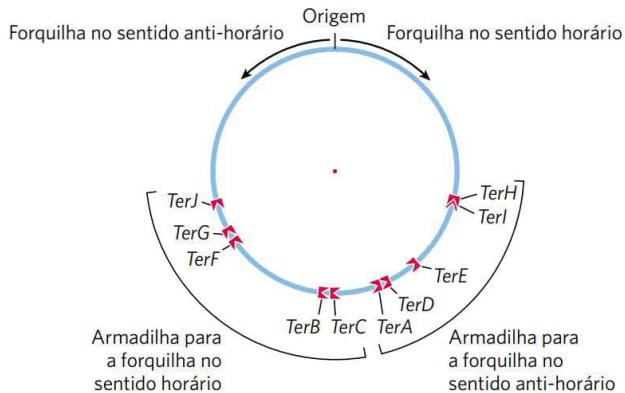


FIGURA 25-17 Terminação da replicação de cromossomos em *E. coli*. As sequências Ter (*TerA* a *TerJ*) são posicionadas no cromossomo em dois grupos com orientações opostas.

outra forquilha para quando encontra a primeira forquilha (presa). As poucas centenas finais de pares de bases de DNA entre esses grandes complexos proteicos são, então, replicadas (por um mecanismo ainda desconhecido), completando dois cromossomos circulares topologicamente interligados (catenados) (**Figura 25-18**). Os círculos de DNA ligados desse modo são conhecidos como **catenanos**. A separação desses círculos catenados em *E. coli* precisa da topoisomerase IV (topoisomerase tipo II). Os cromossomos separados, então, segregam-se em células-filhas na divisão celular. A fase terminal da replicação de outros cromossomos circulares, incluindo muitos dos vírus de DNA que infectam células eucarióticas, é semelhante.

A replicação em células eucarióticas é semelhante, porém mais complexa

As moléculas de DNA nas células de eucariotos são consideravelmente maiores do que aquelas nas bactérias e são organizadas em estruturas de nucleoproteínas complexas (cromatina; p. 972). As características essenciais da replicação do DNA são as mesmas em eucariotos e bactérias, e muitos dos complexos proteicos são conservados funcional e estruturalmente. Todavia, a replicação eucariótica é regulada e coordenada com o ciclo celular, introduzindo algumas complexidades adicionais.

As origens de replicação têm uma estrutura bem caracterizada em alguns eucariotos inferiores, mas são muito menos conhecidas em eucariotos superiores. Em vertebrados, várias sequências ricas em A=T podem ser utilizadas para a iniciação da replicação, e os sítios podem variar de uma divisão celular para outra. A levedura (*S. cerevisiae*) tem origens de replicação definidas, denominadas sequências de replicação autônomas (ARs), ou **replicadores**. Os replicadores de leveduras estendem-se por aproximadamente 150 pb e contêm várias sequências conservadas e essenciais. Cerca de 400 replicadores estão distribuídos entre 16 cromossomos de um genoma haploide de levedura.

A regulação garante que todo DNA celular seja replicado uma vez por ciclo celular. A maior parte dessa regulação envolve proteínas denominadas ciclinas e cinases depen-

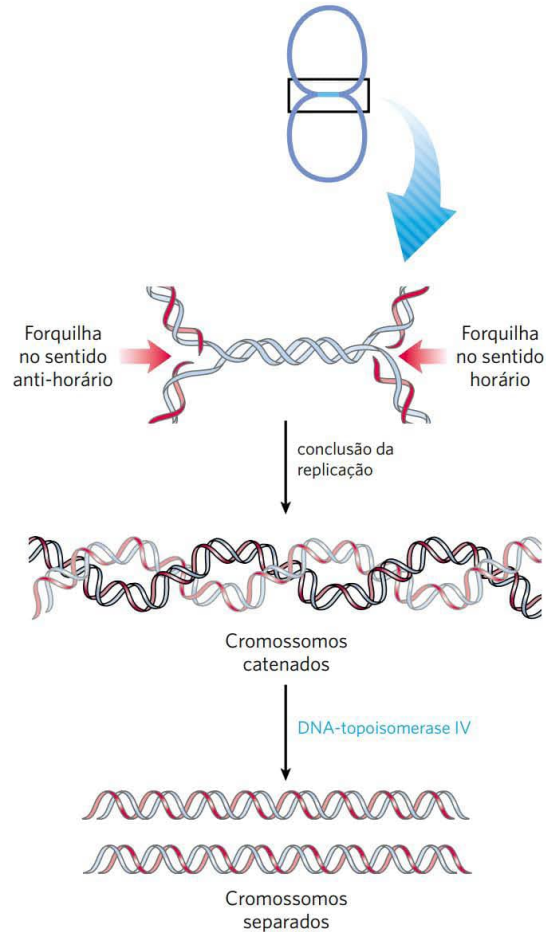


FIGURA 25-18 Papel das topoisomerases na terminação da replicação. A replicação do DNA separando forquilha de replicação opostas deixa os cromossomos concluídos unidos como catenanos, ou como círculos topologicamente interligados. Os círculos não são ligados covalentemente, porém, como eles estão entrelaçados e cada um está fechado covalentemente, eles não podem ser separados – exceto pela ação das topoisomerases. Em *E. coli*, uma topoisomerase tipo II, conhecida como DNA-topoisomerase IV, desempenha o papel principal na separação dos cromossomos catenados, quebrando transitariamente ambas as fitas de DNA de um cromossomo e permitindo que o outro cromossomo passe pela quebra.

dentes de ciclina (CDK) com as quais elas formam complexos (p. 477). As ciclinas são rapidamente destruídas pela proteólise dependente de ubiquitina no final da fase M (mitose), e a ausência de ciclinas permite o estabelecimento de **complexos pré-replicativos (pré-RC)** nos sítios de iniciação de replicação. Em células de crescimento rápido, o pré-RC forma-se no fim da fase M. Em células de crescimento lento, ele não se forma até o fim de G1. A formação do pré-RC confere à célula competência para replicação, um evento às vezes chamado de **licenciamento**.

Assim como em bactérias, o evento-chave na iniciação da replicação em todos os eucariotos é o carregamento da helicase replicativa, um complexo hetero-hexamérico de **proteínas de manutenção de minicromossomos (MCM)**

(MCM2 a MCM7). A helicase MCM2-7 em forma de anel funciona de certa forma como a helicase DnaB bacteriana, apesar de se translocar 3'→5' ao longo do molde da fita-líder. Ela é carregada no DNA por outro complexo de seis proteínas, chamado de **ORC** (complexo de reconhecimento de origem) (**Figura 25-19**). O ORC tem cinco domínios AAA+-ATPase entre suas subunidades e é funcionalmente análogo à DnaA bacteriana. Duas outras proteínas, CDC6 (ciclo de divisão celular) e CDT1 (CDC10 dependente do transcrito 1), tam-

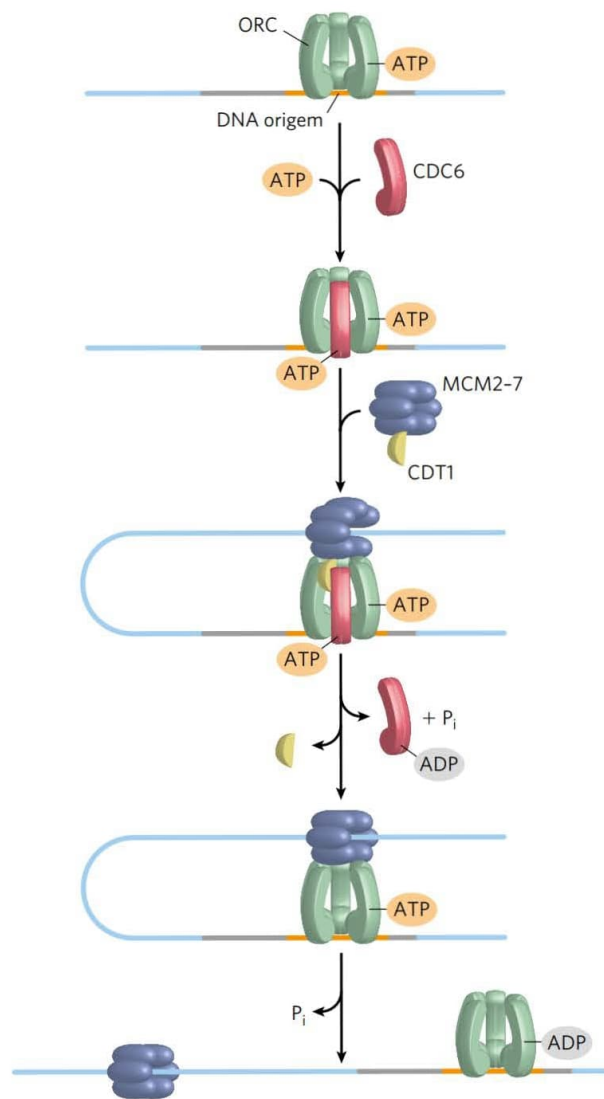


FIGURA 25-19 Montagem de um complexo pré-replicativo em uma origem de replicação eucariótica. O sítio de iniciação (origem) é ligado por ORC, CDC6 e CDT1. Estas proteínas, muitas das quais AAA+-ATPases, promovem o carregamento da helicase replicativa, MCM2-7, em uma reação análoga ao carregamento da helicase DnaB bacteriana pela proteína DnaC. O carregamento do complexo helicase MCM para o DNA forma o complexo pré-replicativo, ou pré-RC, e é a etapa-chave na iniciação da replicação. [Fonte: informação de U. Sivaprasad et al., in *DNA Replication and Human Disease* (M. L. DePamphilis, ed.), p. 141, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2006.]

bém são necessárias para carregar o complexo MCM2-7, e o CDC6 de levedura é outra AAA+-ATPase.

O compromisso com a replicação precisa da síntese e da atividade dos complexos ciclina-CDK da fase S (como o complexo ciclina E-CDK2; ver Figura 12-33) e CDC7-DBF4. Ambos os tipos de complexos auxiliam a ativar a replicação, ligando-se a várias proteínas e as fosforilando no pré-RC. Outras ciclinas e CDK funcionam para inibir a formação de mais complexos pré-RC, uma vez que a replicação tenha se iniciado. Por exemplo, o CDK2 liga-se à ciclina A à medida que os níveis de ciclina E diminuem durante a fase S, inibindo o CDK2 e impedindo que novos complexos pré-RC se iniciem.

A velocidade de movimentação da forquilha de replicação em eucariotos (~ 50 nucleotídeos/s) é apenas um vigésimo daquela observada em *E. coli*. Nessa velocidade, a replicação de um cromossomo humano médio a partir de uma única origem levaria mais de 500 horas. A replicação de cromossomos humanos, de fato, segue bidirecionalmente a partir de várias origens, espaçadas de 30 a 300 kbp. Os cromossomos de eucariotos são quase sempre bem maiores que cromossomos bacterianos, de modo que origens múltiplas são provavelmente uma característica universal de células eucarióticas.

Assim como as bactérias, os eucariotos têm vários tipos de DNA-polimerases. Algumas foram associadas a funções específicas, como a replicação do DNA mitocondrial. A replicação dos cromossomos nucleares envolve principalmente três DNA-polimerases com várias subunidades. A **DNA-polimerase ϵ** altamente processiva sintetiza a fita-líder, e a **DNA-polimerase δ** sintetiza a fita tardia. Ambas as enzimas têm atividades exonucleásicas 3'→5' de revisão. A **DNA-polimerase α** , uma DNA-polimerase/primerase, sintetiza iniciadores de RNA e os estende em cerca de 10 nucleotídeos de DNA. Uma subunidade de DNA-polimerase α tem uma atividade primase e a maior subunidade ($M_r \sim 180.000$) contém a atividade de polimerização. No entanto, essa polimerase não possui atividade exonucleásica 3'→5' de revisão, tornando-a inadequada para a replicação de DNA de alta fidelidade.

As DNA-polimerases ϵ e δ estão associadas com e estimuladas pelo antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA; M_r 29,000), uma proteína encontrada em grandes quantidades nos núcleos de células em proliferação. A estrutura tridimensional do PCNA é muito semelhante àquela da subunidade β da DNA-polimerase III de *E. coli* (Figura 25-9b), embora a homologia da sequência primária não seja evidente. PCNA tem uma função análoga àquela da subunidade β , formando um grampo circular que aumenta a processividade das duas polimerases.

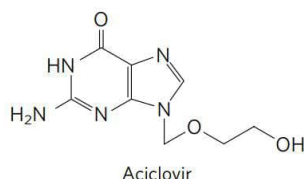
Dois outros complexos proteicos também funcionam na replicação do DNA eucariótico. RPA (proteína de replicação A) é uma proteína de ligação de DNA de fita simples de eucariotos, equivalente em função à proteína SSB de *E. coli*. RFC (fator de replicação C) é um carreador de braçadeiras para PCNA e facilita a montagem dos complexos de replicação ativos. As subunidades do complexo RFC apresentam uma semelhança de sequência significativa com as subunidades do complexo de carregamento de braçadeira (complexo γ) bacteriano.

Em cromossomos lineares de eucariotos, o término da replicação envolve a síntese de estruturas especiais, denominadas **telômeros**, nas extremidades de cada cromossomo, como discutido no próximo capítulo.

DNA-polimerases virais fornecem alvos para a terapia antiviral



Muitos vírus de DNA codificam suas próprias DNA-polimerases, e algumas delas são alvo de medicamentos. Por exemplo, a DNA-polimerase do vírus *herpes simplex* é inibida pelo aciclovir, um composto desenvolvido por Gertrude Elion e George Hitchings (p. 901). O aciclovir consiste em uma guanina presa a um anel de ribose incompleto.



Ele é fosforilado por uma timidina-cinase codificada pelo vírus; o aciclovir liga-se a essa enzima viral com uma afinidade 200 vezes maior que sua ligação à timidina-cinase da célula hospedeira. Isso garante que a fosforilação ocorra principalmente nas células infectadas por vírus. As cinases celulares convertem o aciclo-GMP resultante a aciclo-GTP, que é tanto inibidor quanto substrato de DNA-polimerases. O aciclo-GTP inibe competitivamente a DNA-polimerase do vírus do herpes mais fortemente que as DNA-polimerases celulares. Como não possui uma 3'-hidroxila, o aciclo-GTP também atua como terminador de cadeia quando incorporado ao DNA. Assim, a replicação viral é inibida em várias etapas. ■

RESUMO 25.1 Replicação do DNA

- A replicação do DNA ocorre com fidelidade muito alta e em um tempo determinado no ciclo celular. A replicação é semiconservativa, cada fita atuando como molde para uma nova fita-filha. Ela é realizada em três fases identificáveis: iniciação, alongamento e terminação. O processo se inicia em uma única origem em bactérias e normalmente segue bidirecionalmente.
- O DNA é sintetizado na direção 5'→3' pelas DNA-polimerases. Na forquilha de replicação, a fita-líder é sintetizada continuamente na mesma direção do movimento da forquilha de replicação; a fita tardia é sintetizada descontinuamente como fragmentos de Okazaki, os quais são subsequentemente ligados.
- A fidelidade da replicação do DNA é mantida por (1) seleção de bases pela polimerase, (2) atividade de revisão da exonuclease 3'→5', que faz parte da maioria das DNA-polimerases, e (3) sistema de reparo específicos para malpareamentos (*mismatches*) deixados para trás após a replicação.
- Muitas células têm várias DNA-polimerases. Em *E. coli*, a DNA-polimerase III é a enzima de replicação principal.

A DNA-polimerase I é responsável por funções especiais durante a replicação, a recombinação e o reparo.

- As fases de iniciação, alongamento e terminação separadas da replicação do DNA envolvem uma série de enzimas e fatores proteicos, muitos pertencentes à família AAA+-ATPase.
- As principais DNA-polimerases replicativas em eucariotos são as DNA-polimerases ϵ e δ . A DNA-polimerase α atua para sintetizar os iniciadores.

25.2 Reparo do DNA

A maioria das células tem apenas dois conjuntos de DNA genômico. Proteínas danificadas e moléculas de RNA podem ser rapidamente substituídas utilizando-se a informação codificada no DNA, mas as moléculas de DNA, em si, são insubstituíveis. Manter a integridade da informação no DNA é um imperativo celular, apoiado por um conjunto elaborado de sistemas de reparo de DNA. O DNA pode ser danificado por vários processos, alguns espontâneos, outros catalisados por agentes ambientais (Capítulo 8). A replicação, em si, pode, muito ocasionalmente, danificar o conteúdo da informação quando erros introduzem pares de bases malpareados (como G pareado com T).

A química do dano do DNA é diversa e complexa. A resposta celular a esse dano inclui uma ampla variedade de sistemas enzimáticos que catalisam algumas das mais interessantes transformações químicas no metabolismo do DNA. Primeiro serão examinados os efeitos das alterações na sequência de DNA e, então, os sistemas de reparo específicos.

As mutações estão ligadas ao câncer



A melhor maneira de ilustrar a importância do reparo do DNA é considerar os efeitos de danos no DNA *não reparado* (uma lesão). O resultado mais sério é uma mudança na sequência de bases do DNA, a qual, se replicada e transmitida a gerações de células futuras, torna-se permanente. Uma alteração permanente na sequência de nucleotídeos de DNA é chamada de **mutação**. As mutações podem envolver a substituição de um par de bases por outro (mutação de substituição) ou a adição ou deleção de um ou mais pares de bases (mutações de inserção ou deleção). Se a mutação afeta um DNA não essencial ou se ela tem um efeito desprezível na função de um gene, ela é conhecida como **mutação silenciosa**. Em raras ocasiões, uma mutação confere alguma vantagem biológica. A maioria das mutações não silenciosas, entretanto, é neutra ou deletéria.

Em mamíferos, há uma forte correlação entre o acúmulo de mutações e o câncer. Um teste simples, desenvolvido por Bruce Ames, mede o potencial de um determinado composto químico de promover algumas mutações facilmente detectadas em uma linhagem bacteriana especializada (**Figura 25-20**). Poucas substâncias químicas encontradas no cotidiano pontuam como mutagênicos nesse teste. Entretanto, dos compostos conhecidos por serem carcinogênicos a partir de longos ensaios em animais, mais de 90% foram considerados como mutagênicos no teste de Ames.

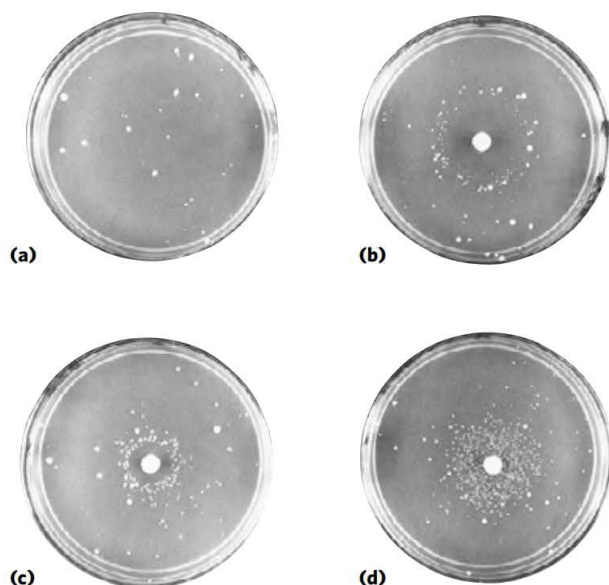


FIGURA 25-20 Teste de Ames para substâncias carcinogênicas, baseado na sua mutagenicidade. Uma linhagem de *Salmonella typhimurium* tendo uma mutação que inativa uma enzima da via biossintética da histidina é colocada em um meio sem histidina. Poucas células crescem. **(a)** As poucas pequenas colônias de *S. typhimurium* que crescem em meio livre de histidina carregam mutações espontâneas que permitem o funcionamento da via biossintética da histidina. Três placas de nutrientes idênticas **(b)**, **(c)** e **(d)** foram inoculadas com um número igual de células. Cada placa recebe, então, um disco ou papel de filtro contendo concentrações progressivamente inferiores de um agente mutagênico. Este aumenta muito a taxa de mutação reversa e, portanto, o número de colônias. As áreas vazias em torno do papel de filtro indicam onde a concentração do agente mutagênico é tão alta que é letal para as células. À medida que essa substância se difunde para longe do papel de filtro, ela é diluída para concentrações subletais que promovem a mutação reversa. Os agentes mutagênicos podem ser comparados com base no seu efeito sobre a taxa de mutação. Como muitos compostos passam por uma variedade de transformações químicas após entrar nas células, eles algumas vezes são testados para mutagenicidade depois de primeiro serem incubados com um extrato de fígado. Algumas substâncias se revelaram mutagênicas apenas após esse tratamento. [Fonte: Bruce N. Ames, University of California, Berkeley, Department of Biochemistry and Molecular Biology.]

Devido a essa forte correlação entre mutagênese e carcinogênese, o teste de Ames para agentes mutagênicos bacterianos é amplamente utilizado como triagem rápida e barata para carcinógenos humanos potenciais.

O DNA genômico em uma típica célula de mamífero acumula muitos milhares de lesões durante um período de 24 horas. Entretanto, como resultado do reparo do DNA, menos de 1 em 1.000 se tornam uma mutação. O DNA é uma molécula relativamente estável, porém, na ausência dos sistemas de reparo, o efeito cumulativo das reações pouco frequentes, mas danosas, tornaria a vida impossível. ■

Todas as células têm sistemas de reparo de DNA múltiplos

O número e a diversidade dos sistemas de reparo refletem tanto a importância do reparo do DNA para a sobrevivência

TABELA 25-5 Tipos de sistemas de reparo de DNA em *E. coli*

Enzimas/proteínas	Tipo de dano
Reparo de malpareamento	
Dam metilase Proteínas MutH, MutL, MutS DNA-helicase II SSB DNA-polimerase III Exonuclease I Exonuclease VII Nuclease RecJ Exonuclease X DNA-ligase	Malpareamentos
Reparo por excisão de bases	
DNA-glicosilases Endonucleases AP DNA-polimerase I DNA-ligase	Bases anormais (uracila, hipoxantina, xantina); bases alquiladas; em alguns outros organismos, dímeros de pirimidina
Reparo por excisão de nucleotídeo	
Excinuclease ABC DNA-polimerase I DNA-ligase	Lesões de DNA que causam grandes mudanças estruturais (p. ex., dímeros de pirimidina)
Reparo direto	
DNA-fotoliasas	Dímeros de pirimidina
O ⁶ -Metilguanina-DNA-metiltransferase	O ⁶ -Metilguanina
Proteína AlkB	1-Metilguanina; 3-metilcitosina

celular quanto as diversas fontes de dano ao DNA (Tabela 25-5). Alguns tipos comuns de lesões, como os dímeros de pirimidina (ver Figura 8-30), podem ser reparados por vários sistemas distintos. Muitos processos de reparo do DNA também parecem ser extraordinariamente ineficientes energeticamente – uma exceção ao padrão observado na grande maioria das vias metabólicas, onde cada ATP é levado em conta e apresenta uma utilização otimizada. Quando a integridade da informação genética está em jogo, a quantidade de energia química investida em um processo de reparo parece quase irrelevante.

O reparo do DNA é possível, em grande parte, porque a molécula de DNA consiste em duas fitas complementares. O DNA danificado em uma fita pode ser removido e substituído, sem introduzir mutações, usando-se a fita complementar não danificada como modelo. Aqui, serão considerados os principais tipos de sistemas de reparo, começando com aqueles que reparam os raros malpareamentos de nucleotídeos que foram deixados para trás pela replicação.

Reparo de malpareamento A correção dos raros malpareamentos deixados para trás após a replicação em *E. coli*

melhora a fidelidade geral da replicação em cerca de 10^2 a 10^3 vezes. Os malpareamentos são quase sempre corrigidos para refletir as informações na fita antiga (molde), que o sistema de reparo pode distinguir da cadeia recém-sintetizada pela presença de etiquetas de grupo metila no DNA-molde. O sistema de reparo de malpareamento de *E. coli* inclui, pelo menos, 12 componentes proteicos (Tabela 25-5) que funcionam na discriminação da fita ou no reparo do próprio processo. As funções de muitos deles foram inicialmente elucidadas por Paul Modrich e colaboradores na década de 1980.

O mecanismo de discriminação da fita não foi determinado para a maioria de bactérias e eucariotos, mas é bem conhecido para *E. coli* e algumas espécies bacterianas intimamente relacionadas. Nessas bactérias, a discriminação da fita se baseia na ação da Dam metilase, que, como você deve se lembrar, metila o DNA na posição N^6 de todas as adeninas no interior das sequências (5')GATC. Imediatamente após a passagem da forquilha de replicação, há um curto período (poucos segundos ou minutos) durante o qual a fita-molde é metilada, mas a fita recém-sintetizada, não (Figura 25-21). O estado transitório não metilado de sequências GATC na fita recém-sintetizada permite que a nova fita seja diferenciada da fita-molde. Malpareamentos de replicação nas proximidades de uma sequência GATC hemimetilada são, então, reparados de acordo com a informação na fita metilada (molde) parental. Se ambas as cadeias são metiladas em uma sequência GATC, poucos malpareamentos são reparados; se nenhuma das fitas estiver metilada, o reparo ocorre, mas não favorece nenhuma delas. O sistema de reparo de malpareamento direcionado por metilação da *E. coli* repara de maneira eficiente os malpareamentos de até 1.000 pb de uma sequência GATC hemimetilada.

Como o processo de correção de malpareamento é dirigido por sequências GATC relativamente distantes? Um mecanismo é ilustrado na Figura 25-22. A proteína MutL forma um complexo com a proteína MutS, e o complexo se liga a todos os pares de bases malpareados (exceto C-C). A proteína MutH liga-se à MutL e às sequências GATC encontradas pelo complexo MutL-MutS. O DNA de ambos os lados do malpareamento é enroscado no complexo MutL-MutS, criando uma volta de DNA; o movimento simultâneo de ambas as pernas da volta através do complexo equivale ao movimento do complexo em ambas as direções ao mesmo tempo, ao longo do DNA. A MutH tem uma atividade de endonuclease sítio-específica que é inativa até que o complexo encontre uma sequência GATC hemimetilada. Nesse sítio, a MutH catalisa a clivagem da fita não metilada no lado 5' da G na GATC, o que marca a fita para reparo. Etapas adicionais na via dependem da localização do malpareamento em relação a esse sítio de clivagem (Figura 25-23).

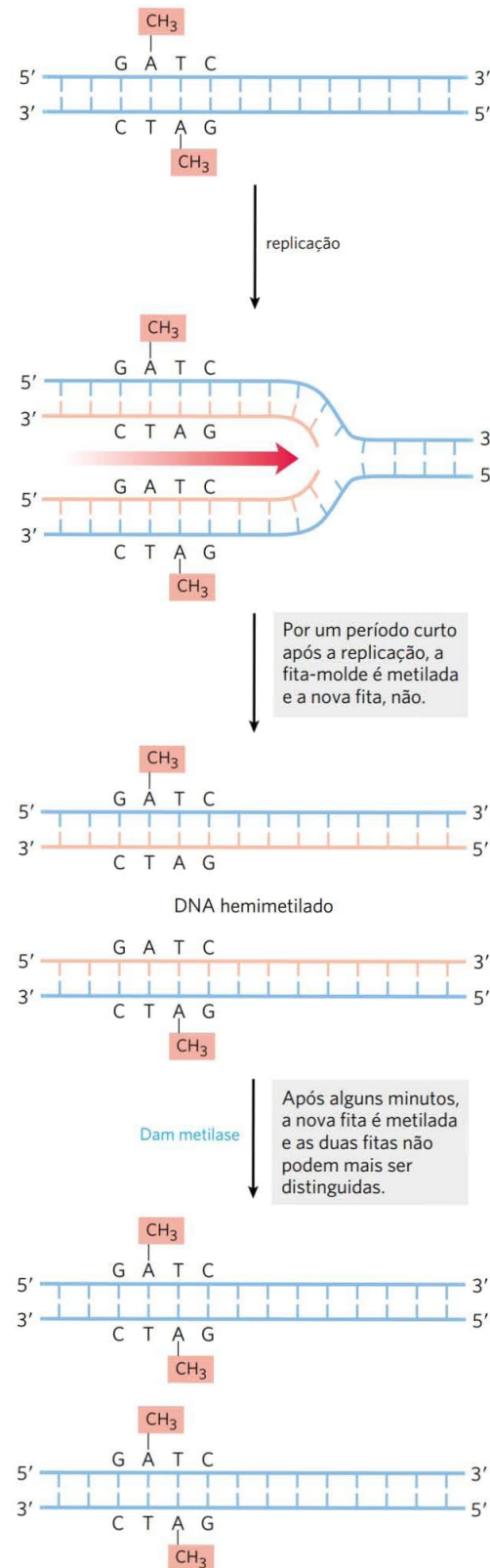


FIGURA 25-21 Metilação e o reparo de malpareamento. A metilação das fitas de DNA pode servir para distinguir as fitas parentais (molde) das fitas recém-sintetizadas no DNA de *E. coli*, função crucial para o reparo de malpareamento (ver Figura 25-22). A metilação ocorre na N^6 das adeninas nas sequências (5')GATC. Essa sequência é um palíndromo (ver Figura 8-18), presente em orientações opostas nas duas fitas.

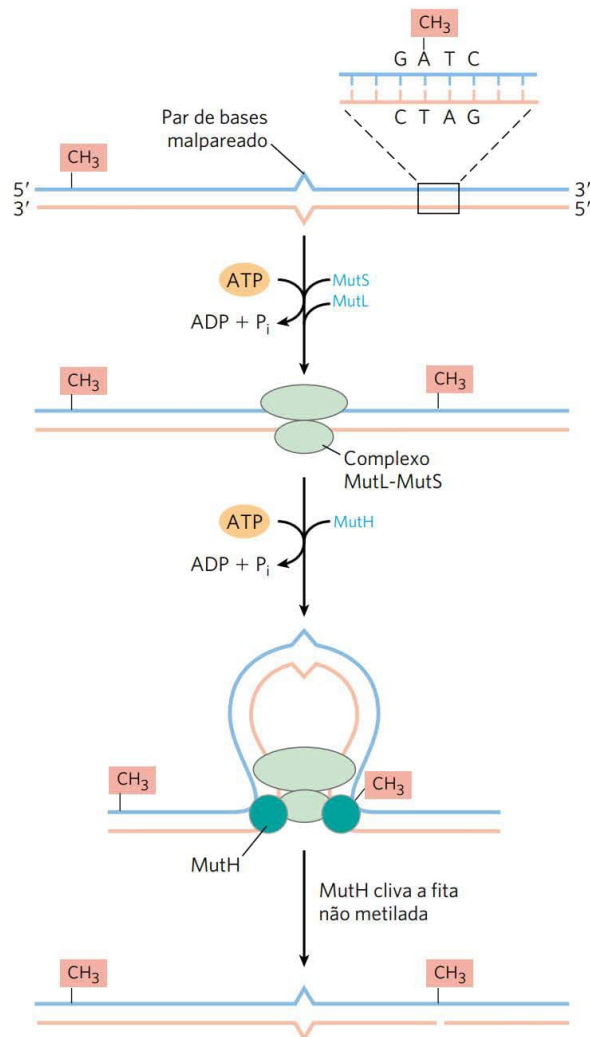


FIGURA 25-22 Um modelo para as etapas iniciais do reparo de malpareamento direcionado por metila. As proteínas envolvidas nesse processo em *E. coli* foram purificadas (ver Tabela 25-5). O reconhecimento da sequência (5')GATC e do malpareamento são funções especializadas das proteínas MutH e MutS, respectivamente. A proteína MutL forma um complexo com MutS no pareamento errado. O DNA é enroscado nesse complexo, de modo que o complexo se move simultaneamente em duas direções ao longo do DNA até que encontra uma proteína MutH ligada a uma sequência GATC hemimetilada. A MutH cliva a fita não metilada no lado 5' da G nessa sequência. Um complexo consistindo na DNA-helicase II e em uma de várias exonucleases degrada, então, a fita de DNA não metilada daquele ponto para o malpareamento (ver Figura 25-23). [Fonte: informação da figura fornecida por Paul Modrich.]

Quando o malpareamento é do lado 5' do sítio de clivagem (Figura 25-23, à direita), a fita não metilada é desenrolada e degradada na direção 3'→5' a partir do sítio de clivagem por malpareamento, e esse segmento é substituído por um DNA novo. Esse processo requer a ação combinada da DNA-helicase II (também chamada de helicase UvrD), SSB, exonuclease I ou exonuclease X (ambas degradam as fitas de DNA na direção 3'→5') ou exonuclease VII (que degrada

as cadeias de DNA de fita simples em qualquer direção), DNA-polimerase III e DNA-ligase. O caminho para o reparo de malpareamentos no lado 3' do local de clivagem é semelhante (Figura 25-23, à esquerda), exceto que a exonuclease é exonuclease VII ou nuclease RecJ (que degrada o DNA de fita simples na direção 5'→3').

O reparo de malpareamento é particularmente caro para *E. coli* em termos de gasto de energia. Ele pode ocorrer com 1.000 ou mais pares de bases a partir da sequência do GATC. A degradação e a substituição de um segmento de fita desse comprimento exigem um investimento enorme em precursores de desoxinucleotídeos ativados para reparar uma *única* base malpareada. Isso reforça mais uma vez a importância da integridade genômica para a célula.

As células eucarióticas também possuem sistemas de reparo de malpareamento, com várias proteínas estruturais e funcionalmente análogas às proteínas MutS e MutL bacterianas (mas não MutH). Alterações nos genes humanos que codificam proteínas desse tipo produzem algumas das síndromes hereditárias mais comuns de suscetibilidade ao câncer (ver Quadro 25-1, p. 1015), o que demonstra ainda mais o valor para o organismo dos sistemas de reparo do DNA. Os principais homólogos de MutS, na maior parte dos eucariotos, de leveduras a seres humanos, são a MSH2 (homóloga de MutS), a MSH3 e a MSH6. Heterodímeros de MSH2 e MSH6 geralmente se ligam a malpareamentos de um único par de bases e se ligam com mais dificuldade a voltas malpareadas um pouco mais longas. Em muitos organismos, os malpareamentos mais longos (2 a 6 pb) podem estar ligados, em vez disso, a um heterodímero de MSH2 e MSH3 ou estar ligados por ambos os tipos de heterodímeros em tandem. Homólogos de MutL, predominantemente um heterodímero de MLH1 (homólogo 1 de MutL) e PMS1 (segregação pós-meiótica), ligam-se a e estabilizam os complexos MSH. Muitos detalhes dos eventos subsequentes no reparo de malpareamento em eucariotos continuam a ser decifrados. Em particular, não sabemos como as cadeias de DNA recém-sintetizadas são identificadas, embora pesquisas revelem que esse processo não envolve sequências GATC.

Reparo de excisão de base As células têm uma classe de enzimas denominadas **DNA-glicosilases** que reconhecem lesões particularmente comuns no DNA (como os produtos da desaminação da citosina e da adenina; ver Figura 8-29a) e removem a base afetada por meio da clivagem da ligação N-glicosídica. Essa clivagem cria um sítio apurínico ou apirimidínico no DNA, comumente denominado **sítio AP** ou **sítio abásico**. Cada DNA-glicosilase é geralmente específica para um tipo de lesão.

As uracilas DNA-glicosilases, por exemplo, encontradas na maioria das células, removem especificamente do DNA a uracila que é resultado da desaminação espontânea da citosina. Células mutantes sem essa enzima apresentam uma taxa elevada de mutações G≡C para A≡T. Essa glicosilase não remove resíduos de uracila do RNA ou resíduos de timina do DNA. A capacidade para distinguir a timina da uracila, o produto da desaminação da citosina – necessário para o reparo seletivo da última – pode ser uma razão pela qual o DNA evoluiu para conter timina, em vez de uracila (p. 297).

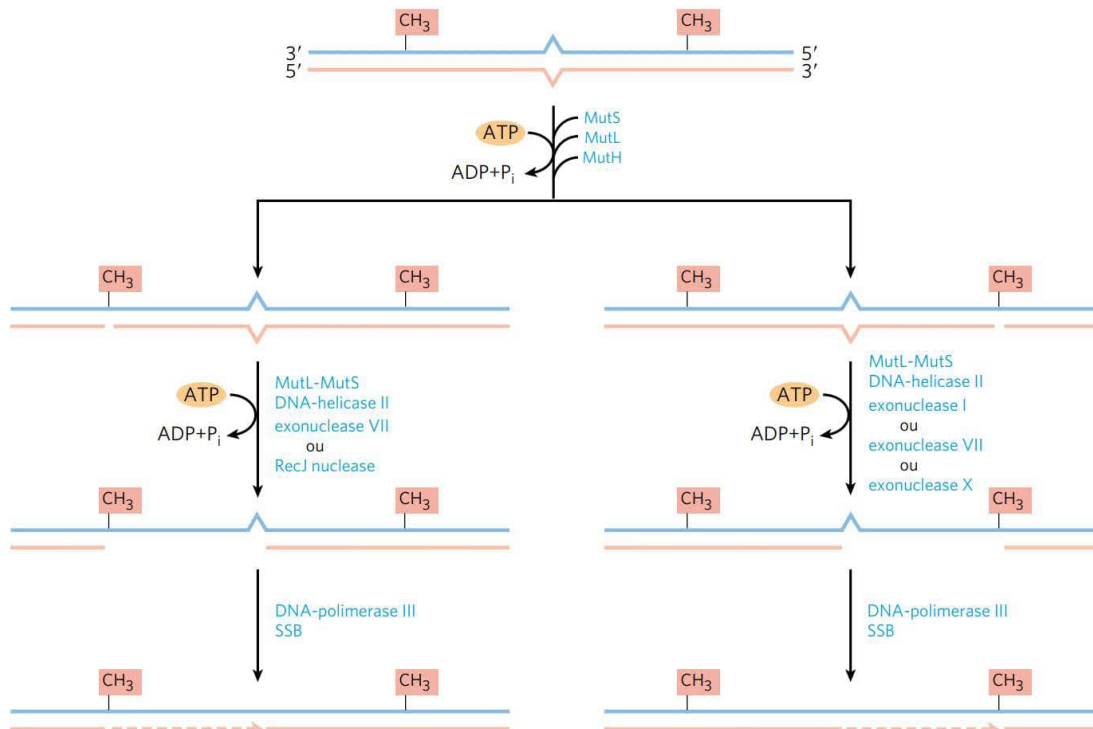


FIGURA 25-23 Conclusão do reparo de malpareamento direcionado por metila. A ação combinada da DNA-helicase II, SSB e de uma de quatro diferentes exonucleases remove um segmento da nova fita entre o sítio de clivagem MutH e um ponto logo adiante do malpareamento. A exonuclease específica depende da localização do local de clivagem em relação ao malpareamento, como mostrado pelas vias alternativas aqui. O intervalo resultante é preenchido (linha tracejada) pela DNA-polimerase III, e o corte é selado pela DNA-ligase (não mostrada).

A maioria das bactérias tem apenas um tipo de uracila DNA-glicosilase, ao passo que os seres humanos possuem pelo menos quatro tipos, com especificidades diferentes – um indicador da importância da remoção da uracila do DNA. A uracila-glicosilase mais abundante em seres humanos, UNG, está associada ao replissomo humano, onde elimina o resíduo U ocasional inserido no lugar de um T durante a replicação. A desaminação de resíduos de C é cem vezes mais rápida no DNA de fita simples do que no DNA de cadeia dupla, e os seres humanos têm uma enzima, hSMUG1, que remove quaisquer resíduos de U que ocorram no DNA de fita simples durante a replicação ou a transcrição. Duas outras DNA-glicosilases humanas, TDG e MBD4, removem tanto resíduos de U quanto de T pareados com G, produzidos pela desaminação de citosina ou de 5-metilcitosina, respectivamente.

Outras DNA-glicosilases reconhecem e removem várias bases danificadas, incluindo a formamidopirimidina e a 8-hidroxi guanina (ambas derivadas da oxidação da purina), hipoxantina (derivada da desaminação da adenina) e bases alquiladas, como a 3-metiladenina e a 7-metilguanina. Glicosilases que reconhecem outras lesões, incluindo os dímeros de pirimidina, também foram identificadas em algumas classes de organismos. Lembre-se de que os sítios AP também surgem da hidrólise lenta e espontânea das ligações *N*-glicosídicas no DNA (ver Figura 8-29b).

Uma vez que o sítio AP tenha se formado por uma DNA-glicosilase, outro tipo de enzima deve repará-lo. O reparo

não é realizado pela simples inserção de uma nova base e a re formação da ligação *N*-glicosila. Em vez disso, a desoxirribose-5'-fosfato deixada para trás é removida e substituída por um novo nucleotídeo. Esse processo começa com uma das **AP endonucleases**, enzimas que cortam a fita de DNA que contém o sítio AP. A posição da incisão relativa ao sítio AP (5' ou 3' em relação ao sítio) depende do tipo da AP endonuclease. Um segmento de DNA incluindo o sítio AP é, então, removido, a DNA-polimerase I substitui o DNA e a DNA-ligase fecha o corte remanescente (**Figura 25-24**). Em eucariotos, a substituição do nucleotídeo é realizada por polimerases específicas, como descrito a seguir.

Reparo de excisão de nucleotídeos Lesões no DNA que provocam grandes distorções na estrutura helicoidal do DNA geralmente são reparadas pelo sistema de excisão de nucleotídeos, uma via de reparo fundamental para a sobrevivência de todos os organismos de vida livre. No reparo de excisão de nucleotídeos (**Figura 25-25**), uma enzima formada por várias subunidades (excinuclease) hidrolisa duas ligações fosfodiésteres, uma de cada lado da distorção provocada pela lesão. Em *E. coli* e outras bactérias, o sistema enzimático hidrolisa a quinta ligação fosfodiéster no lado 3' e a oitava ligação fosfodiéster no lado 5' para gerar um fragmento de 12 a 13 nucleotídeos (dependendo de se a lesão envolve uma ou duas bases). Em seres humanos e outros eucariotos, o sistema enzimático hidrolisa a sexta ligação fosfodiéster no lado 3' e a vigésima segunda ligação fosfodiéster no lado

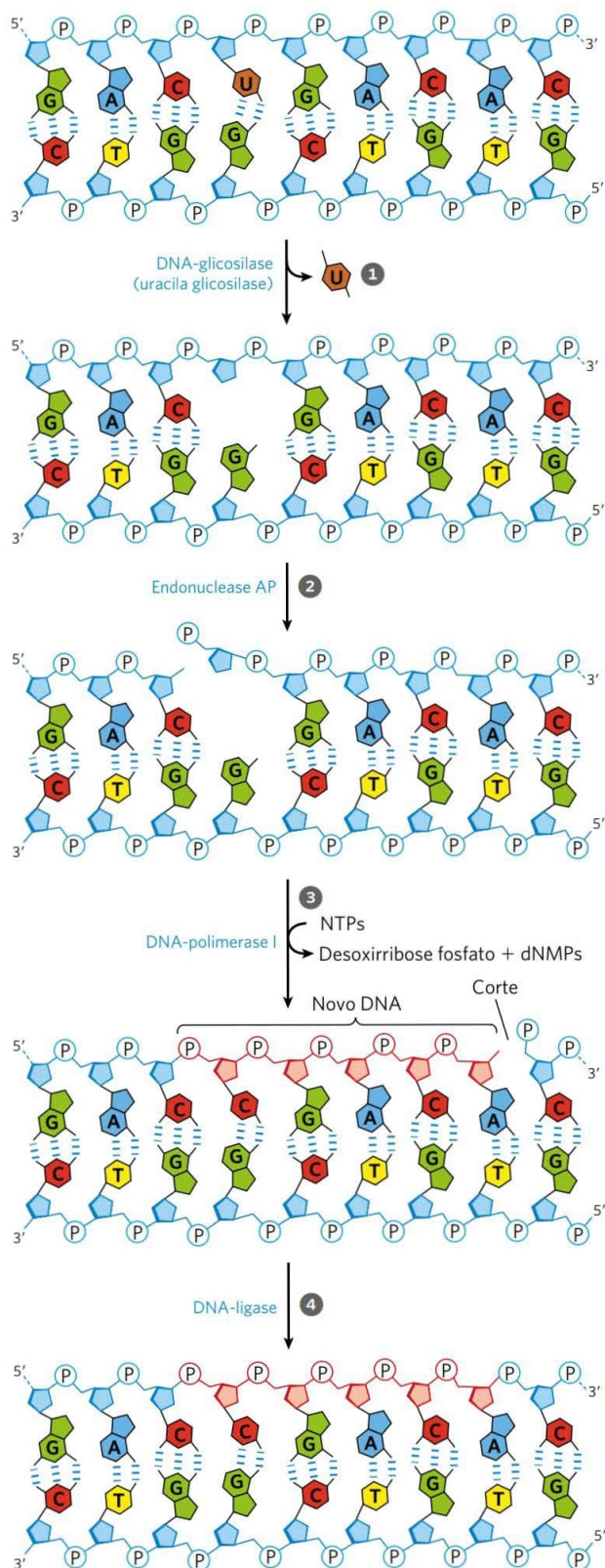


FIGURA 25-24 Reparo do DNA pela via do reparo por excisão de bases. 1 Uma DNA-glicosilase reconhece uma base danificada (nesse caso, uma uracila) e cliva entre a base e a desoxirribose no esqueleto do DNA. 2 Uma endonuclease AP cliva o esqueleto de fosfodiéster perto do sítio AP. 3 A DNA-polimerase I inicia a síntese de reparo a partir da hidroxila 3' no corte, removendo (com sua atividade de exonuclease 5'→3') e substituindo uma porção da fita danificada. 4 O corte remanescente depois que a DNA-polimerase I se dissociou é selado pela DNA-ligase.

5', produzindo um fragmento de 27 a 29 nucleotídeos. Após a incisão dupla, os oligonucleotídeos retirados são liberados do dúplice, e o espaço resultante é preenchido – pela DNA-polimerase I em *E. coli* e pela DNA-polimerase ϵ em seres humanos. A DNA-ligase fecha o corte.

Em *E. coli*, o complexo enzimático chave é a excinuclease ABC, que possui três subunidades, UvrA (M_r 104.000), UvrB (M_r 78.000) e UvrC (M_r 68.000). O termo “excinuclease” é utilizado para descrever a capacidade única desse complexo enzimático de catalisar duas clivagens endonucleotídicas específicas, diferenciando essa atividade daquela de endonucleases-padrão. Um complexo de proteínas UvrA e UvrB (A_2B) analisa o DNA e se liga ao sítio da lesão. O dímero UvrA, então, dissocia-se, liberando um forte complexo UvrB-DNA. A proteína UvrC, então, liga-se à UvrB, e esta faz uma incisão na quinta ligação fosfodiéster, no lado 3' da lesão. Segue-se uma incisão mediada por UvrC na oitava ligação fosfodiéster no lado 5'. O fragmento resultante de 12 a 13 nucleotídeos é removido pela helicase UvrD. O pequeno intervalo criado desse modo é preenchido pela DNA-polimerase I e pela DNA-ligase. Essa via (Figura 25-25, à esquerda) é a principal rota de reparo para muitos tipos de lesões, incluindo os dímeros de ciclobutano pirimidina, fotoprodutos 6-4 (ver Figura 8-30) e vários outros tipos de adutos de bases, incluindo a benzo[*a*]piranoguanina, que é formada no DNA pela exposição à fumaça de cigarro. A atividade nucleolítica da excinuclease ABC é nova no sentido em que dois cortes são feitos no DNA.

O mecanismo das excinucleases de eucariotos é muito semelhante àquele da enzima bacteriana, embora sejam necessários pelo menos 16 polipeptídeos sem qualquer semelhança com as subunidades excinuclease de *E. coli* para a incisão dupla. Alguns dos reparos de excisão de nucleotídeos e reparo de excisão de bases em eucariotos estão intimamente ligados à transcrição (ver Capítulo 26). As deficiências genéticas em reparo de excisão de nucleotídeos em seres humanos levam a várias doenças graves (ver Quadro 25-1).

Reparo direto Vários tipos de danos são reparados sem a remoção de uma base ou nucleotídeo. O exemplo mais bem caracterizado é a fotorreativação direta dos dímeros de pirimidina no anel ciclobutano, reação promovida pelas **DNA-fotolases**. Os dímeros de pirimidina resultam de uma reação induzida por UV. Por meio de um mecanismo elucidado por Aziz Sancar e colaboradores, as fotolases usam energia derivada da luz absorvida para reverter danos (Figura 25-26). As fotolases geralmente contêm dois cofatores que servem como agentes absorvedores de luz,

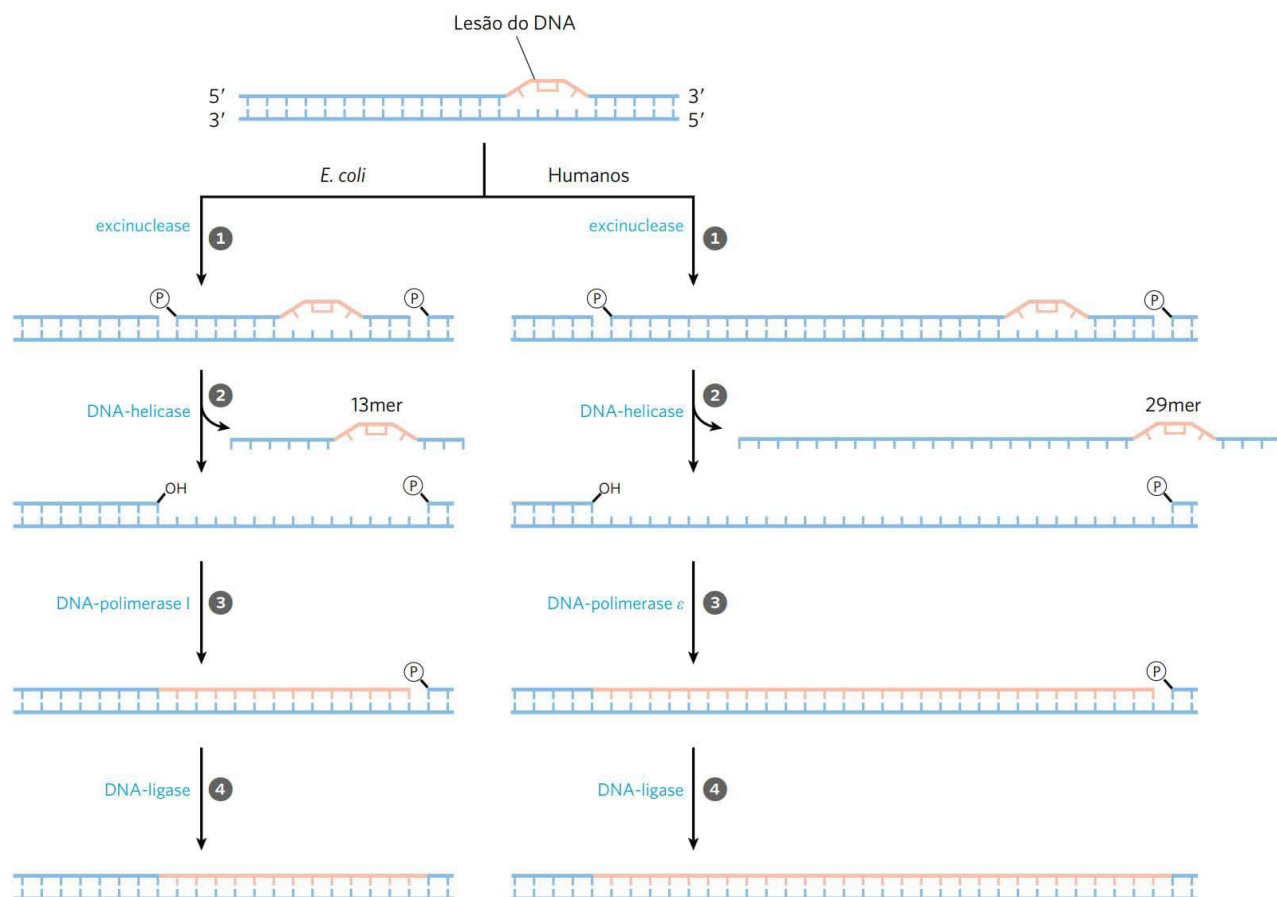
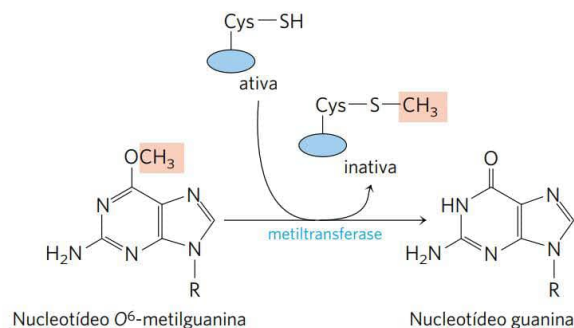


FIGURA 25-25 Reparo por excisão de nucleotídeos em *E. coli* e seres humanos. A via geral do reparo por excisão de nucleotídeos é semelhante em todos os organismos. ① Uma excinuclease se liga ao DNA no local de uma lesão extensa e cliva a fita do DNA lesionado de cada lado da lesão. ② O segmento de DNA – de 13 nucleotídeos (13mer) ou 29 nucleotídeos (29mer) – é removido com o auxílio de uma helicase. ③ O intervalo é preenchido pela DNA-polimerase e ④ o corte remanescente é selado com a DNA-ligase. [Fonte: informação da figura fornecida por Aziz Sancar.]

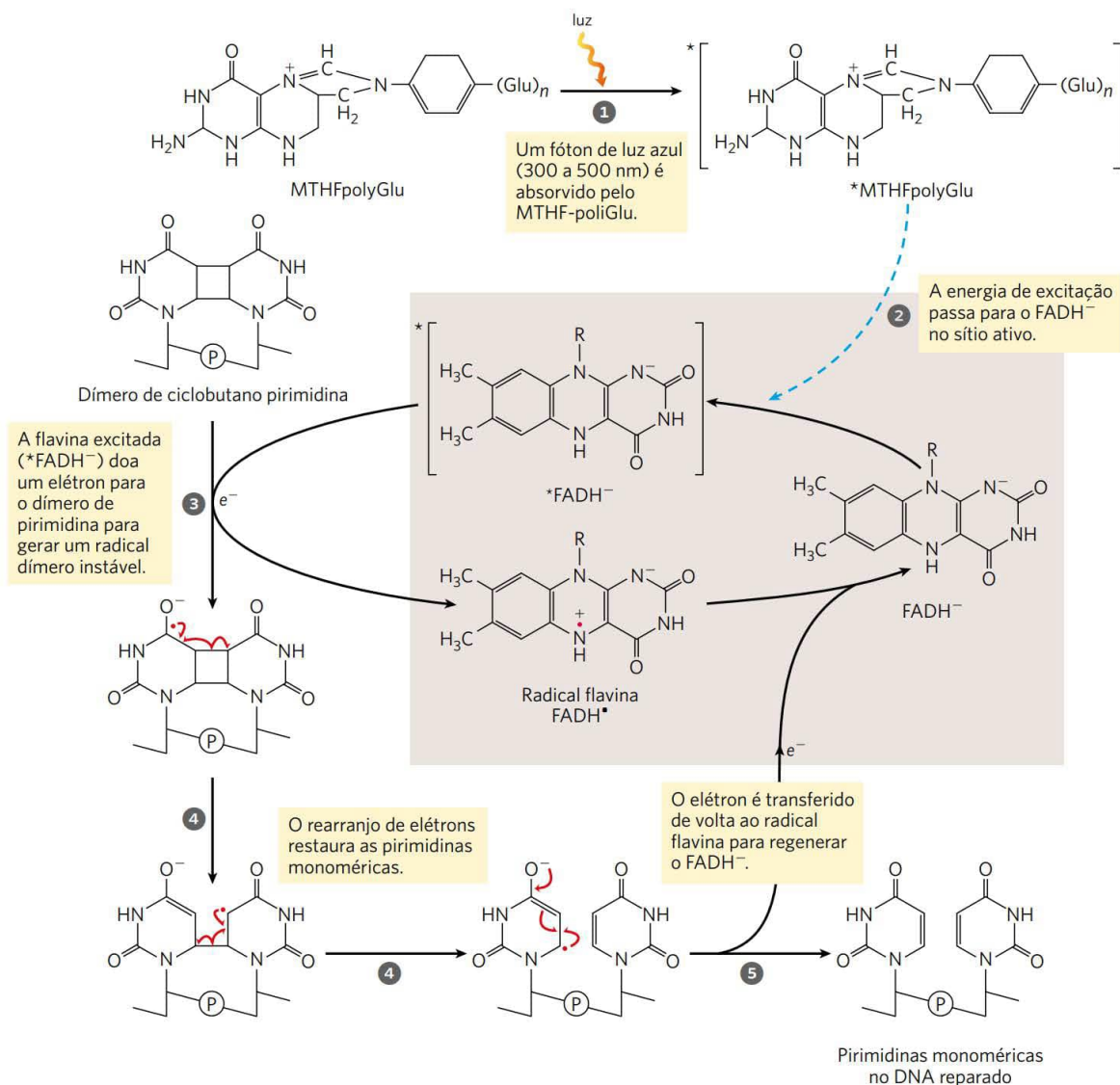
ou cromóforos: em todos os organismos, um é FADH_2 ; em *E. coli* e leveduras, o outro é um folato. O mecanismo de reação implica na geração de radicais livres. As DNA-fotoliasas não são encontradas em seres humanos e outros mamíferos placentários.

Exemplos adicionais são vistos no reparo de nucleotídeos com dano de alquilação. O nucleotídeo modificado O^6 -metilguanina se forma na presença de agentes alquilantes e é uma lesão altamente mutagênica e comum (p. 299). Ele tende a parear com timina, em vez de citosina, durante a replicação e, portanto, causa mutações $\text{G} \rightleftharpoons \text{C}$ para $\text{A} \rightleftharpoons \text{T}$ (Figura 25-27). O reparo direto de O^6 -metilguanina é realizado por O^6 -metilguanina-DNA-metiltransferase, proteína que catalisa a transferência do grupo metil da O^6 -metilguanina para um de seus próprios resíduos Cys. Esta metiltransferase não é estritamente uma enzima, visto que um único evento de transferência de metila determina a metilação permanente da proteína, inativando-a nesta via. O consumo de uma molécula inteira de proteína para corrigir uma

única base danificada é outra vívida ilustração da prioridade dada à manutenção da integridade do DNA celular.



Um mecanismo muito diferente, mas igualmente direto, é utilizado para reparar 1-metiladenina e 3-metilcitosina. Os grupos aminos dos resíduos de A e C algumas vezes são metilados quando o DNA é uma fita simples, e a metilação



MECANISMO-FIGURA 25-26 Reparo de dímeros de pirimidina com fotoliase. A energia derivada da luz absorvida é usada para reverter a fotoreação que causou a lesão. Os dois cromóforos na fotoliase da *E. coli* (*M*, 54.000), $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -meteniltetra-hidrofolilpoliglutamato (MTHFpolyGlu) e FADH^- , realizam funções complementares. O MTHFpolyGlu funciona como uma fotoantena para absorver fótons de luz azul. A energia de excitação passa para o FADH^- , e a flavina excitada ($^*\text{FADH}^-$) doa um elétron para o dímero de pirimidina, resultado no rearranjo mostrado.

afeta diretamente o pareamento de bases adequado. Em *E. coli*, a desmetilação oxidativa desses nucleotídeos alquilados é mediada pela proteína AlkB, um membro da super-família dioxigenase dependente de α -cetoglutarato- Fe^{2+} (Figura 25-28). (Ver, no Quadro 4-3, a descrição de outro membro dessa família de enzimas.)

A interação das forquilha de replicação com o dano do DNA pode levar à síntese de DNA translesão propensa a erro

As vias de reparo consideradas até agora geralmente trabalham apenas para lesões no DNA de dupla-fita, a fita não danificada fornecendo a informação genética correta para restaurar a fita danificada ao seu estado original. Todavia,

em alguns tipos de lesões, como as quebras na dupla-fita, ligações cruzadas na dupla-fita ou lesões em um DNA de fita simples, a fita complementar é, ela mesma, danificada, ou está ausente. Quebras na dupla-fita e lesões no DNA de fita simples surgem mais frequentemente quando uma forquilha de replicação encontra uma lesão não reparada no DNA (Figura 25-29). Essas lesões e as ligações cruzadas de DNA também podem resultar de radiação ionizante e reações oxidativas.

Em uma forquilha de replicação parada, em bactérias, há dois caminhos para reparo. Na ausência de uma segunda fita, a informação necessária para um reparo preciso deve vir de um cromossomo separado e homólogo. O sistema de reparo envolve, portanto, recombinação genética de homólogos.

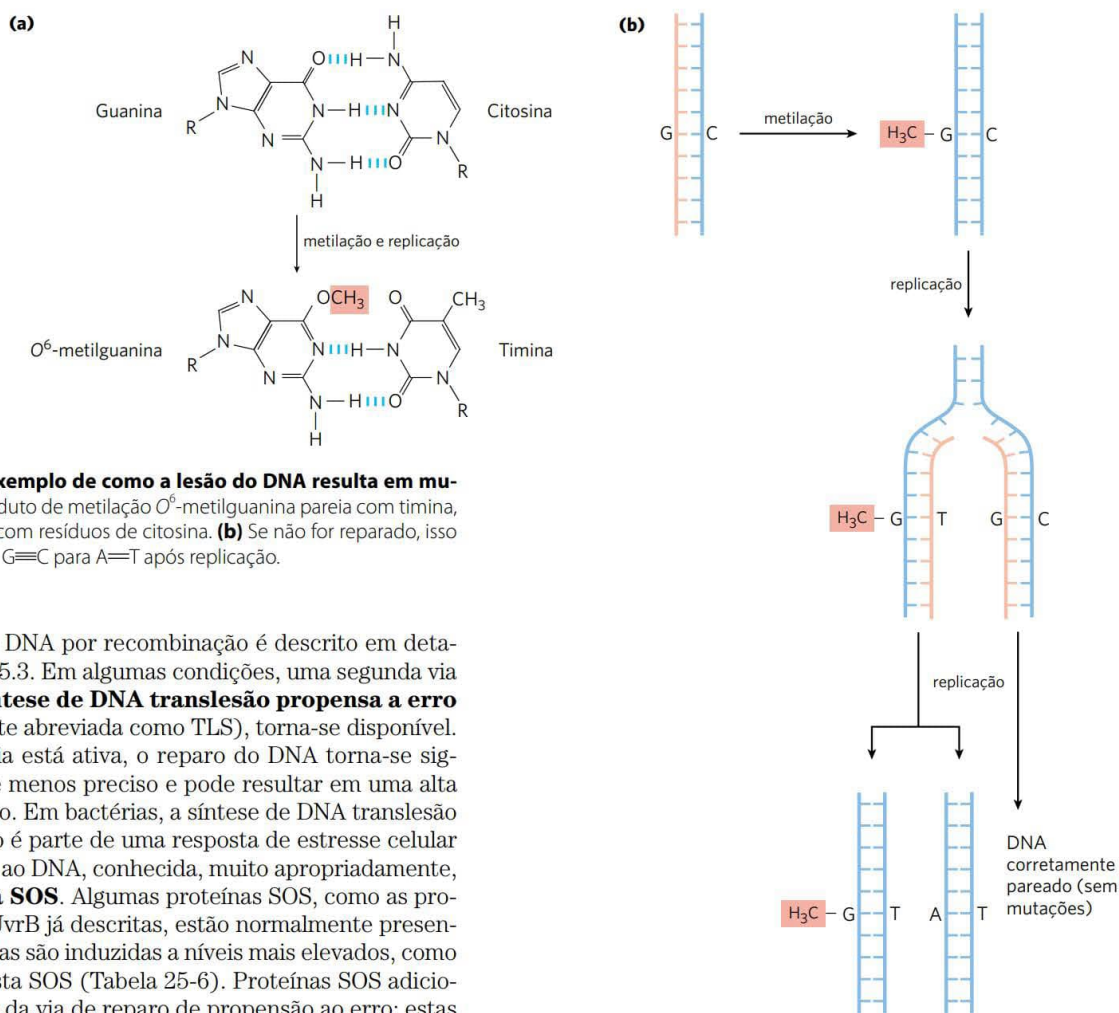


FIGURA 25-27 Exemplo de como a lesão do DNA resulta em mutações. (a) O produto de metilação O⁶-metilguanina pareia com timina, em vez de parear com resíduos de citosina. (b) Se não for reparado, isso leva à mutação de G≡C para A=T após replicação.

Esse reparo de DNA por recombinação é descrito em detalhes na Seção 25.3. Em algumas condições, uma segunda via de reparo, a **síntese de DNA translesão propensa a erro** (frequentemente abreviada como TLS), torna-se disponível. Quando essa via está ativa, o reparo do DNA torna-se significativamente menos preciso e pode resultar em uma alta taxa de mutação. Em bactérias, a síntese de DNA translesão propensa a erro é parte de uma resposta de estresse celular a extenso dano ao DNA, conhecida, muito apropriadamente, como **resposta SOS**. Algumas proteínas SOS, como as proteínas UvrA e UvrB já descritas, estão normalmente presentes na célula, mas são induzidas a níveis mais elevados, como parte da resposta SOS (Tabela 25-6). Proteínas SOS adicionais participam da via de reparo de propensão ao erro; estas incluem as proteínas UmuC e UmuD (“Umu” de imutável; a

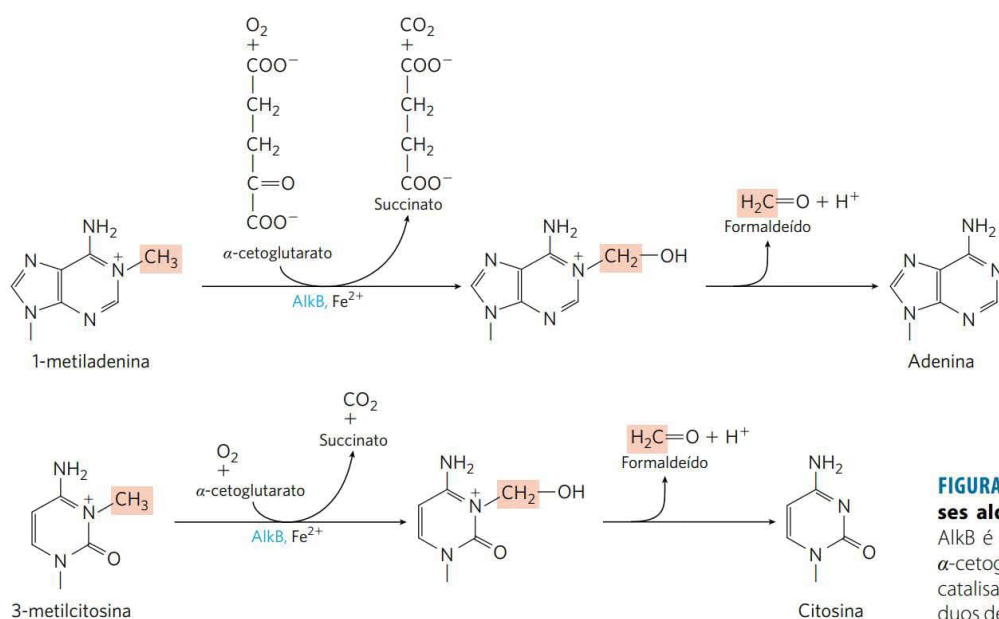


FIGURA 25-28 Reparo direto das bases alquiladas por AlkB. A proteína AlkB é uma hidroxilase dependente de α -cetoglutarato-Fe²⁺ (ver Quadro 4-3). Ela catalisa a desmetilação oxidativa dos resíduos de 1-metiladenina e 3-metilcitosina.

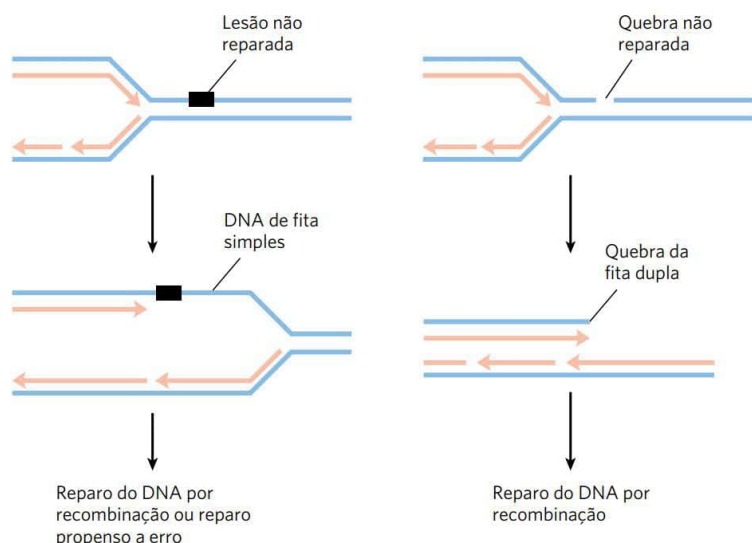


FIGURA 25-29 Lesão do DNA e seu efeito na replicação do DNA. Se a forquilha de replicação encontra uma lesão não reparada ou quebra na fita, a replicação geralmente para e a forquilha pode colapsar. Uma lesão é deixada para trás em um segmento de DNA de fita simples não replicado (à esquerda); uma quebra de fita se torna uma quebra de dupla-fita (à direita). Em cada caso, o dano a uma fita não pode ser reparado pelos mecanismos descritos anteriormente neste capítulo, pois a fita complementar necessária para dirigir o reparo precisa estar lesionada ou ausente. Há dois possíveis caminhos para o reparo: reparo do DNA por recombinação (uma via é descrita na Figura 25-30) ou, quando as lesões são anormalmente numerosas, reparo propenso a erro. O último mecanismo envolve uma DNA-polimerase nova (DNA-polimerase V, codificada pelos genes *umuC* e *umuD* e ativada pela proteína RecA) que pode replicar, ainda que de forma imprecisa, sobre muitos tipos de lesões. O mecanismo de reparo é “propenso a erro” porque frequentemente ocorrem mutações.

falta do gene *umu* elimina o reparo de propensão ao erro). A proteína UmuD é clivada em um processo regulado por SOS para uma forma mais curta, denominada UmuD', que forma um complexo com UmuC e uma proteína denominada RecA (descrito na Seção 25.3) para criar uma DNA-polimerase especializada, DNA-polimerase V (UmuD'₂UmuCRecA),

a qual pode replicar muitas lesões no DNA que normalmente bloqueariam a replicação. O pareamento de bases adequado é com frequência impossível no sítio dessa lesão, de modo que essa replicação translesão é propensa a erro.

Dada a ênfase na importância da integridade genômica ao longo deste capítulo, a existência de um sistema que au-

TABELA 25-6 Genes induzidos como parte da resposta SOS em *E. coli*

Nome do gene	Proteína codificada e/ou papel no reparo do DNA
Genes de função conhecida	
<i>polB</i> (<i>dinA</i>)	Codifica a subunidade de polimerização da DNA-polimerase II, necessária para o reinício da replicação no reparo do DNA por recombinação
<i>uvrA</i> } <i>uvrB</i> }	Codifica as subunidades UvrA e UvrB da excinuclease ABC
<i>umuC</i> } <i>umuD</i> }	Codifica as subunidades central e de polimerização da DNA-polimerase V
<i>sulA</i>	Codifica a proteína que inibe a divisão celular, possivelmente para dar tempo para o reparo do DNA
<i>recA</i>	Codifica a proteína RecA, necessária ao reparo propenso a erro e ao reparo por recombinação
<i>dinB</i>	Codifica a DNA-polimerase IV
<i>dinD</i>	Codifica a proteína que inibe a função da recombinase RecA
<i>ssb</i>	Codifica a proteína de ligação do DNA de fita simples (SSB)
<i>himA</i>	Codifica a subunidade do fator de integração do hospedeiro (IHF), envolvido na recombinação sítio-específica, replicação, transposição, regulação da expressão gênica
Genes envolvidos no metabolismo do DNA, mas com papel desconhecido no reparo do DNA	
<i>uvrD</i>	Codifica a DNA-helicase II (proteína de desenrolamento do DNA)
<i>recN</i>	Necessária para o reparo por recombinação
Genes de função desconhecida	
<i>dinF</i>	

Nota: alguns dos genes e suas funções são discutidos em mais detalhes no Capítulo 28.

menta a taxa de mutação pode parecer incoerente. Entretanto, é possível pensar nesse sistema como uma estratégia desesperada. Os genes *umuC* e *umuD* são totalmente induzidos apenas no final da resposta SOS, e eles não são ativados para a síntese translesão iniciada pela clivagem da UmuD, a menos que os níveis de dano ao DNA sejam particularmente elevados e todas as forquilha de replicação estejam bloqueadas. As mutações resultantes da replicação mediada pela DNA-polimerase V matam algumas células e criam mutações deletérias em outras, porém esse é o preço metabólico que uma espécie paga para superar o que, de outro modo, seria uma barreira intransponível para a replicação, uma vez que ela permite, pelo menos, a sobrevivência de poucas células-filhas mutantes.

Contudo, outra DNA-polimerase, a DNA-polimerase IV, também é induzida durante a resposta SOS. A replicação pela DNA-polimerase IV, um produto do gene *dinB*, é também altamente propensa a erro. As DNA-polimerases IV e V bacterianas (Tabela 25-1) são parte da família de polimerases TLS encontradas em todos os organismos. Essas enzimas não apresentam exonuclease de revisão e têm um sítio ativo mais aberto do que outras DNA-polimerases, um que acomoda nucleotídeos-molde danificados. Com essas enzimas, a fidelidade da seleção de base durante a replicação pode ser reduzida por um fator de 10^2 , diminuindo a fidelidade total da replicação para um erro em aproximadamente 1.000 nucleotídeos.

Nos mamíferos, a família das polimerases TLS possuem muitas DNA-polimerases de baixa fidelidade. Entretanto, a presença dessas enzimas não se traduz, necessariamente, em

um inaceitável fardo mutacional, uma vez que a maior parte dessas enzimas também tem funções especializadas no reparo do DNA. A DNA-polimerase η (eta), por exemplo, encontrada em todos os eucariotos, promove a síntese translesão principalmente por meio de dímeros T-T no anel ciclobutano. Poucas mutações resultam nesse caso, visto que a enzima insere preferencialmente dois resíduos de A a partir dos resíduos de T ligados. Várias outras polimerases de baixa fidelidade, incluindo DNA-polimerases β , ι (iota) e λ , têm funções especializadas no reparo de excisão de bases de eucariotos. Cada uma dessas enzimas tem uma atividade 5'-desoxirribose-fosfato-liase além de sua atividade de polimerase. Após a remoção de base por uma glicosilase e clivagem do esqueleto por uma AP endonuclease, essas polimerases removem o sítio abásico (uma 5'-desoxirribose-fosfato) e preenchem o espaço muito curto. A frequência de mutação devido à atividade da DNA-polimerase η é minimizada pelos comprimentos muito curtos (frequentemente um nucleotídeo) de DNA sintetizado.

O que surge a partir de pesquisas dos sistemas de reparo de DNA celular é o cenário de um metabolismo de DNA que mantém a integridade genômica com sistemas múltiplos e, com frequência, redundantes. No genoma humano, mais de 130 genes codificam proteínas dedicadas ao reparo do DNA. Em muitos casos, a perda de função de uma dessas proteínas resulta em instabilidade genômica e em um aumento na ocorrência de oncogênese (Quadro 25-1). Esses sistemas de reparo são frequentemente integrados com os sistemas de replicação do DNA e são complementados por sistemas de recombinação, abordados a seguir.

QUADRO 25-1



MEDICINA

Reparo do DNA e câncer

Os cânceres em seres humanos desenvolvem-se quando genes que regulam a divisão celular normal (oncogenes e genes supressores de tumor; Capítulo 12) não funcionam, são ativados no momento errado ou são alterados. Como consequência, as células podem crescer sem controle e formar um tumor. Os genes que controlam a divisão celular podem ser danificados por mutação espontânea ou substituídos pela invasão de um vírus tumoral (Capítulo 26). Não é surpreendente que alterações nos genes de reparo do DNA que resultam em uma taxa aumentada de mutação elevem enormemente a suscetibilidade de um indivíduo ao câncer. Defeitos nos genes que codificam as proteínas envolvidas no reparo de excisão de nucleotídeos, reparo de malpareamento, reparo por recombinação e síntese de DNA translesão propensa a erro estão todos ligados a cânceres em seres humanos. De modo evidente, o reparo do DNA pode ser uma questão de vida e morte.

O reparo de excisão de nucleotídeos necessita de um número maior de proteínas em seres humanos do que em bactérias, embora as vias gerais sejam bastante semelhantes. Os defeitos genéticos que inativam o reparo de excisão de nucleotídeos foram associados a várias doenças genéticas; a mais bem estudada é o xeroderma pigmentoso (XP). Como o reparo de excisão de nucleotídeos é a única via de reparo para dímeros de pirimidina em seres humanos, pessoas com XP são extremamente sensíveis à luz e rapidamente desenvolvem cânceres de pele indu-

zidos pela luz solar. A maior parte das pessoas com XP também apresenta anormalidades neurológicas, presumivelmente devido à sua inabilidade de reparar algumas lesões causadas por uma alta taxa de metabolismo oxidativo em neurônios. Defeitos nos genes que codificam qualquer um de pelo menos sete componentes proteicos diferentes do sistema de reparo de excisão de nucleotídeos podem resultar em XP, levando ao surgimento de sete grupos genéticos diferentes, denominados de XPA até XPG. Várias dessas proteínas (notavelmente XPB, XPD e XPG) também atuam no reparo por excisão de base acoplada à transcrição de lesões oxidativas, descritas no Capítulo 26. Observe que XPC e XPE são partes de complexos que reconhecem DNA danificado, ao passo que XPA, XPB, XPD, XPF e XPG são todos os componentes de um complexo multissubunidade muito maior que representa a excinuclease humana mostrada na Figura 25-25. Essas proteínas estão envolvidas na realização de incisões no DNA e na remoção do segmento de DNA de 29 mer.

A maioria dos microrganismos tem vias redundantes para o reparo de dímeros de pirimidina no anel ciclobutano – lançando mão de DNA-fotolases e, algumas vezes, do reparo de excisão de bases, como alternativas ao reparo de excisão de nucleotídeos –, exceto em seres humanos e em outros mamíferos placentários. Essa ausência de um *backup* para o reparo de excisão de nucleotídeos para remover dímeros de pirimidina levou à especulação de

(Continua)

QUADRO 25-1



MEDICINA

Reparo do DNA e câncer (Continuação)

que a evolução inicial dos mamíferos envolveu pequenos animais noturnos e peludos com pouca necessidade de reparo de danos UV. Entretanto, os mamíferos têm uma via para evitar translesões de dímeros de pirimidina no anel ciclobutano, a qual envolve DNA-polimerase η . Essa enzima preferencialmente insere dois resíduos de A do lado oposto de um dímero de pirimidina T-T, minimizando mutações. Pessoas com uma condição genética na qual a função da DNA-polimerase η está ausente exibem uma doença semelhante ao XP, conhecida como variante XP ou XP-V. As manifestações clínicas de XP-V são semelhantes às daquelas das doenças XP clássicas, embora os níveis de mutação sejam mais elevados na XP-V quando as células são expostas à luz UV. De modo aparente, o sistema de reparo de excisão de nucleotídeos trabalha em conjunto com a DNA-polimerase η nas células humanas normais, reparando e/ou ignorando os dímeros de pirimidina segundo o necessário para manter o crescimento celular e o andamento da replicação do DNA. A exposição à luz UV introduz uma carga pesada de dímeros de pirimidina, e alguns devem ser ignorados pela síntese translesão para manter a replicação em curso. Quando um sistema está ausente, ele é parcialmente compensado pelo outro. Uma perda da atividade de DNA-polimerase η leva à parada das forquilha de replicação e ao desvio das lesões UV pelas polimerases de síntese translesão (TLS) diferentes e mais mutagênicas. Como ocorre quando outros sistemas de reparo de DNA estão ausentes, o resultado do aumento do número de mutações com frequência leva ao câncer.

Uma das síndromes hereditárias mais comuns de suscetibilidade ao câncer é o câncer de colo hereditário não polipoide (HNPCC). Essa síndrome foi associada a defeitos de reparo de malpareamento. Células humanas e de outros eucariotos têm várias proteínas análogas às proteínas bacterianas MutL e MutS (ver Figura 25-22). Defeitos em pelo menos cinco genes de reparo de malpareamento podem levar a HNPCC. Os mais prevalentes são defeitos nos genes *hMLH1* (homólogo 1 do MutL humano) e *hMSH2* (homólogo 2 do MutS humano). Em indivíduos com HNPCC, o câncer geralmente se desenvolve em idade precoce, sendo os cânceres de colo os mais comuns.

A maioria dos cânceres de mama humanos ocorre em mulheres sem qualquer predisposição conhecida. No entanto, cerca de 10% dos casos são associados a defeitos hereditários em dois genes, *BRCA1* e *BRCA2*. As *BRCA1* e *BRCA2* humanas são proteínas grandes (1.834 e 3.418 resíduos de aminoácidos, respectivamente) que interagem com várias outras proteínas envolvidas na transcrição, na manutenção de cromossomos, no reparo do DNA e no controle do ciclo celular. A *BRCA2* foi associada ao reparo de DNA por recombinação de quebras da dupla-fita. Um dos papéis-chave da *BRCA2* é carregar o homólogo RecA humano, denominado Rad51, para o DNA em sítios de quebras de dupla-fita. A *BRCA1* tem papéis ainda pouco definidos no reparo de quebras de dupla-fita, transcrição e alguns outros processos do metabolismo do DNA. Mulheres com defeitos nos genes *BRCA1* ou *BRCA2* têm uma chance maior que 80% de desenvolver câncer de mama.

RESUMO 25.2 Reparo de DNA

- As células têm vários sistemas para reparo do DNA. O reparo de malpareamento em *E. coli* é direcionado por sequências transitórias não metiladas de (5')GATC na fita recém-sintetizada.
- Sistemas de reparo de excisão de bases reconhecem e reparam danos causados por agentes ambientais (como radiação e agentes alquilantes) e reações espontâneas de nucleotídeos. Alguns sistemas de reparo reconhecem e excisam apenas bases danificadas ou incorretas, deixando um sítio AP (abásico) no DNA. Este é reparado pela excisão e substituição do segmento de DNA que contém o sítio AP.
- Os sistemas de reparo de excisão de nucleotídeos reconhecem e removem várias lesões extensas e dímeros de pirimidina. Eles retiram um segmento de fita de DNA que inclui a lesão, deixando um espaço preenchido pela ação de DNA-polimerases e ligases.
- Alguns danos ao DNA são reparados por reversão direta da reação que causou o dano: dímeros de pirimidina são diretamente convertidos a pirimidinas monoméricas por uma fotoliase, e o grupo metil de *O*⁶-metilguanina é removido por uma metiltransferase.
- Em bactérias, a síntese de DNA translesão propensa a erro, envolvendo DNA-polimerases TLS, ocorre em res-

posta a um dano muito grande ao DNA. Em eucariotos, polimerases semelhantes têm funções especializadas no reparo do DNA que minimizam a introdução de mutações.

25.3 Recombinação do DNA

O rearranjo da informação genética no interior e entre as moléculas de DNA envolve vários processos, coletivamente colocados sob o título de recombinação genética. As aplicações práticas dos rearranjos de DNA na alteração dos genomas de um número crescente de organismos estão agora sendo exploradas (Capítulo 9).

Os eventos de recombinação genética caem em pelo menos três grandes classes. A **recombinação genética homóloga** (também chamada de recombinação geral) envolve alterações genéticas entre duas moléculas de DNA quaisquer (ou segmentos da mesma molécula) que compartilham uma região estendida de sequência praticamente idêntica. A sequência real de bases é irrelevante, desde que seja semelhante nos dois DNA. Na **recombinação sítio-específica**, as trocas ocorrem apenas em uma sequência *específica* do DNA. A **transposição de DNA** é diferente das outras duas classes, uma vez que geralmente envolve um segmento curto de DNA com a capacidade marcante para se mover de uma localização no cromossomo para outra. Esses “genes saltadores” (*jumping genes*) foram inicialmente observados no milho, na década de 1940, por Barbara McClintock.



Barbara McClintock,
1902-1992
[Fonte: Foto AP]

Além disso, existe uma ampla gama de rearranjos genéticos incomuns para os quais ainda não foi proposto nenhum mecanismo ou objetivo. Aqui, serão estudadas três classes gerais.

A recombinação genética homóloga é uma via amplamente usada para reparar quebras de dupla-fita no DNA. Um processo alternativo para reparo de quebra de dupla-fita, denominado **união de extremidades não homólogas (NHEJ)**, também está descrito aqui. As funções dos sistemas de recombinação

genética são tantas quanto os seus mecanismos. Elas incluem papéis em sistemas de reparo de DNA especializados, atividades especializadas na replicação do DNA, regulação da expressão de certos genes, facilitação da segregação adequada de cromossomos durante a divisão celular eucariótica, manutenção da diversidade genética e implementação de rearranjos genéticos programados durante o desenvolvimento em-

brionário. Na maior parte dos casos, a recombinação genética está intimamente integrada a outros processos no metabolismo do DNA, e isso se torna um tema da presente discussão.

A recombinação homóloga bacteriana é uma função de reparo do DNA

Em bactérias, a recombinação genética homóloga é principalmente um processo de reparo do DNA e, nesse contexto (como observado na Seção 25.2), é denominado **reparo do DNA por recombinação**. Ele é geralmente direcionado para a reconstrução das forquilha de replicação que pararam ou colapsaram no local do dano do DNA. A recombinação genética homóloga também pode ocorrer durante a conjugação (*mating*), quando o DNA cromossômico é transferido de uma célula bacteriana (doadora) para outra (recipiente). A recombinação durante a conjugação, embora rara em populações bacterianas selvagens, contribui para a diversidade genética.

Um exemplo do que ocorre quando uma forquilha de replicação encontra um dano no DNA é mostrado na **Figura 25-30**. Uma característica comum das vias de reparo do DNA

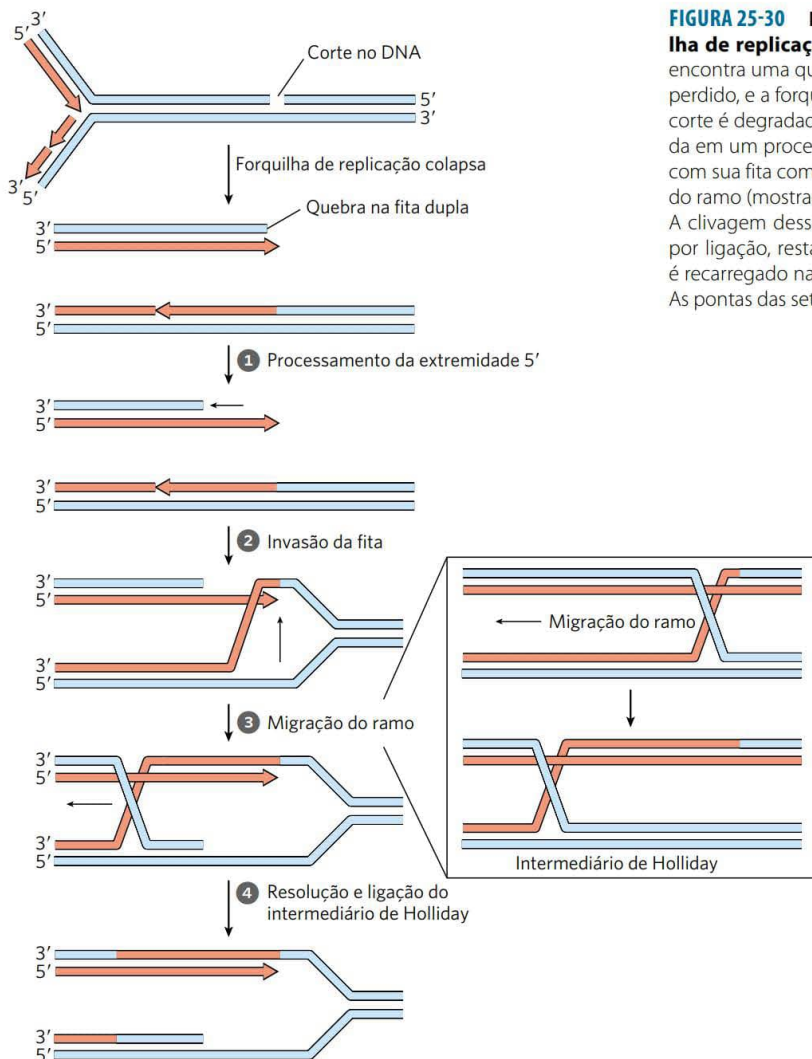


FIGURA 25-30 Reparo de DNA por recombinação em uma forquilha de replicação colapsada. Quando uma forquilha de replicação encontra uma quebra em uma das fitas-molde, um braço da forquilha é perdido, e a forquilha de replicação colapsa. A extremidade 5' da fita no corte é degradada para criar uma extensão 3' de fita simples, então usada em um processo de invasão da fita, pareando a fita simples invasora com sua fita complementar no interior do dúplice adjacente. A migração do ramo (mostrado no quadro) pode criar um intermediário de Holliday. A clivagem desse intermediário por nucleases especializadas, seguida por ligação, restaura uma forquilha de replicação viável. O replissomo é recarregado na sua estrutura (não mostrado), e a replicação continua. As pontas das setas representam extremidades 3'.

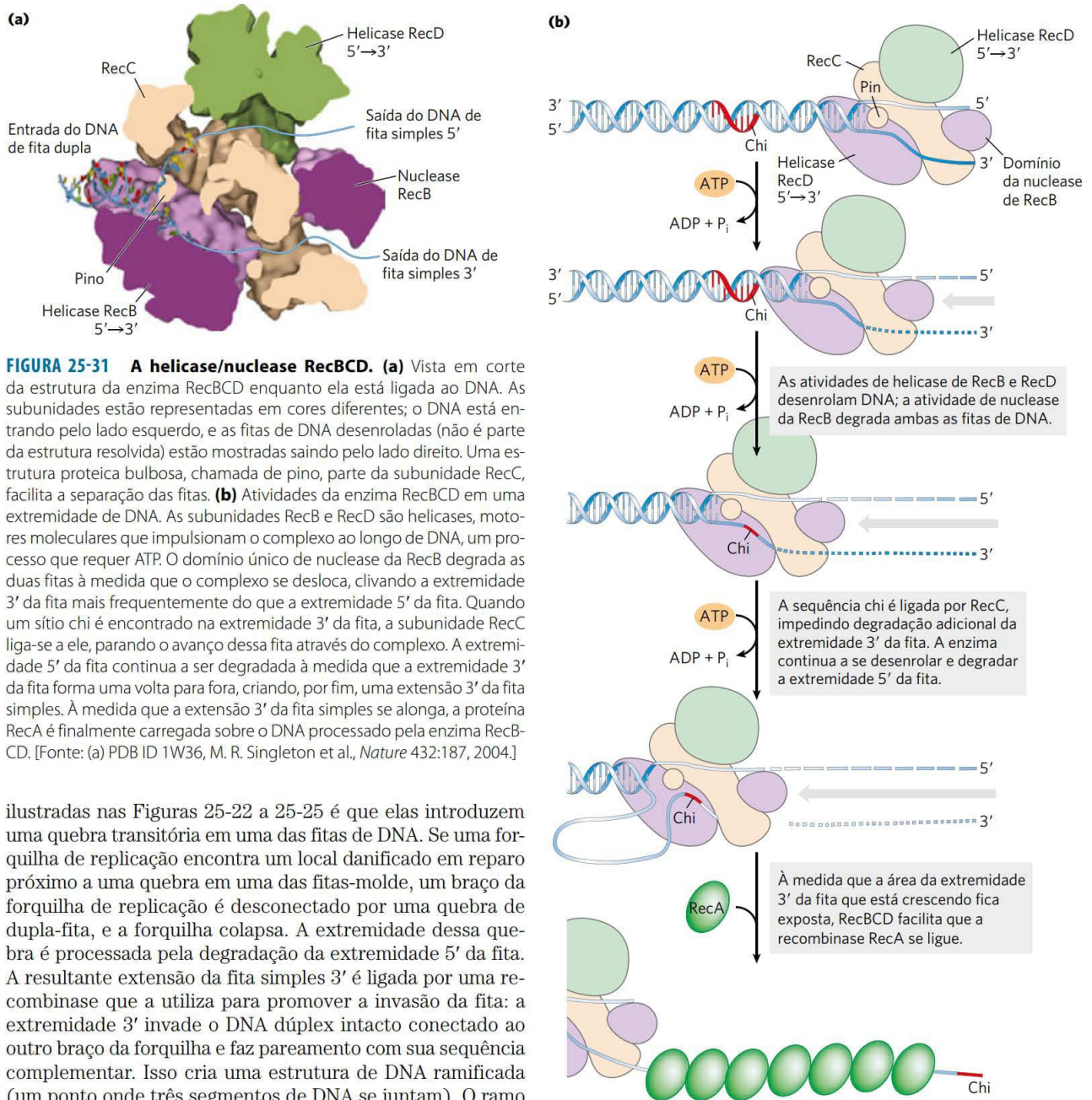


FIGURA 25-31 A helicase/nuclease RecBCD. (a) Vista em corte da estrutura da enzima RecBCD enquanto ela está ligada ao DNA. As subunidades estão representadas em cores diferentes; o DNA está entrando pelo lado esquerdo, e as fitas de DNA desenroladas (não é parte da estrutura resolvida) estão mostradas saindo pelo lado direito. Uma estrutura proteica bulbosa, chamada de pino, parte da subunidade RecC, facilita a separação das fitas. (b) Atividades da enzima RecBCD em uma extremidade de DNA. As subunidades RecB e RecD são helicases, motores moleculares que impulsionam o complexo ao longo do DNA, um processo que requer ATP. O domínio único de nuclease da RecB degrada as duas fitas à medida que o complexo se desloca, clivando a extremidade 3' da fita mais frequentemente do que a extremidade 5' da fita. Quando um sítio chi é encontrado na extremidade 3' da fita, a subunidade RecC liga-se a ele, parando o avanço dessa fita através do complexo. A extremidade 5' da fita continua a ser degradada à medida que a extremidade 3' da fita forma uma volta para fora, criando, por fim, uma extensão 3' da fita simples. À medida que a extensão 3' da fita simples se alonga, a proteína RecA é finalmente carregada sobre o DNA processado pela enzima RecBCD. [Fonte: (a) PDB ID 1W36, M. R. Singleton et al., *Nature* 432:187, 2004.]

ilustradas nas Figuras 25-22 a 25-25 é que elas introduzem uma quebra transitória em uma das fitas de DNA. Se uma forquilha de replicação encontra um local danificado em reparo próximo a uma quebra em uma das fitas-molde, um braço da forquilha de replicação é desconectado por uma quebra de dupla-fita, e a forquilha colapsa. A extremidade dessa quebra é processada pela degradação da extremidade 5' da fita. A resultante extensão da fita simples 3' é ligada por uma recombinase que a utiliza para promover a invasão da fita: a extremidade 3' invade o DNA dúplice intacto conectado ao outro braço da forquilha e faz pareamento com sua sequência complementar. Isso cria uma estrutura de DNA ramificada (um ponto onde três segmentos de DNA se juntam). O ramo de DNA pode ser movido em um processo denominado **migração do ramo** para criar uma estrutura cruzada semelhante a um X, conhecida como **intermediário de Holliday**, em homenagem ao pesquisador Robin Holliday, que primeiro postulou sua existência. O intermediário de Holliday é clivado, ou “resolvido,” por uma classe especial de nucleases. O processo todo reconstrói a forquilha de replicação.

Em *E. coli*, o processo de terminação do DNA é promovido pela nuclease/helicase RecBCD. A enzima RecBCD liga-se ao DNA linear em uma extremidade livre (quebrada) e se move para dentro ao longo da dupla-hélice, desenrolando e degradando o DNA em uma reação acoplada à hidrólise do ATP (**Figura 25-31**). As subunidades RecB e RecD são motores da helicase, com RecB se movendo na direção 3'→5' ao longo de uma fita e a RecD se movendo na direção

5'→3' ao longo da outra fita. A atividade da enzima é alterada quando ela interage com uma sequência denominada **chi**, (5')GCTGGTGG, que se liga fortemente a um sítio na subunidade RecC. A partir desse ponto, a degradação da fita com a terminação 3' é muito reduzida, mas a degradação da fita 5' terminal aumenta. Esse processo cria um DNA de fita simples com uma extremidade 3', que é utilizado durante as etapas subsequentes na recombinação. As 1.009 sequências chi espalhadas por todo o genoma de *E. coli* potencializam a frequência de recombinação em cerca de 5 a 10 vezes dentro de 1.000 pb do sítio chi. A potencialização diminui com o aumento da distância do sítio chi. Sequências que potencia-

FIGURA 25-32 Filamentos da proteína RecA. A RecA e outras recombinações nessa classe funcionam como filamentos de nucleoproteína. **(a)** A formação do filamento prossegue nas etapas de nucleação discreta e extensão. A nucleação é a adição das poucas primeiras subunidades de RecA. A extensão ocorre pela adição de subunidades de RecA, de forma que o filamento cresce na direção 5'→3'. Quando ocorre a desmontagem, as subunidades são retiradas da extremidade traseira. **(b)** Eletromicrografia colorizada de um filamento de RecA ligado ao DNA. **(c)** Segmento do filamento de RecA com quatro voltas em hélices (24 subunidades de RecA). Observe o DNA de dupla-fita ligado no centro. O domínio central da RecA é estruturalmente relacionado aos domínios das helicases. [Fontes: (b) com permissão do Estate of Ross Inman. Agradecimentos especiais para Kim Voss. (c) Modificada de PDB ID 3CMX, Z. Chen et al., *Nature* 453:489, 2008.]

lizam a frequência de recombinação também foram identificadas em vários outros organismos.

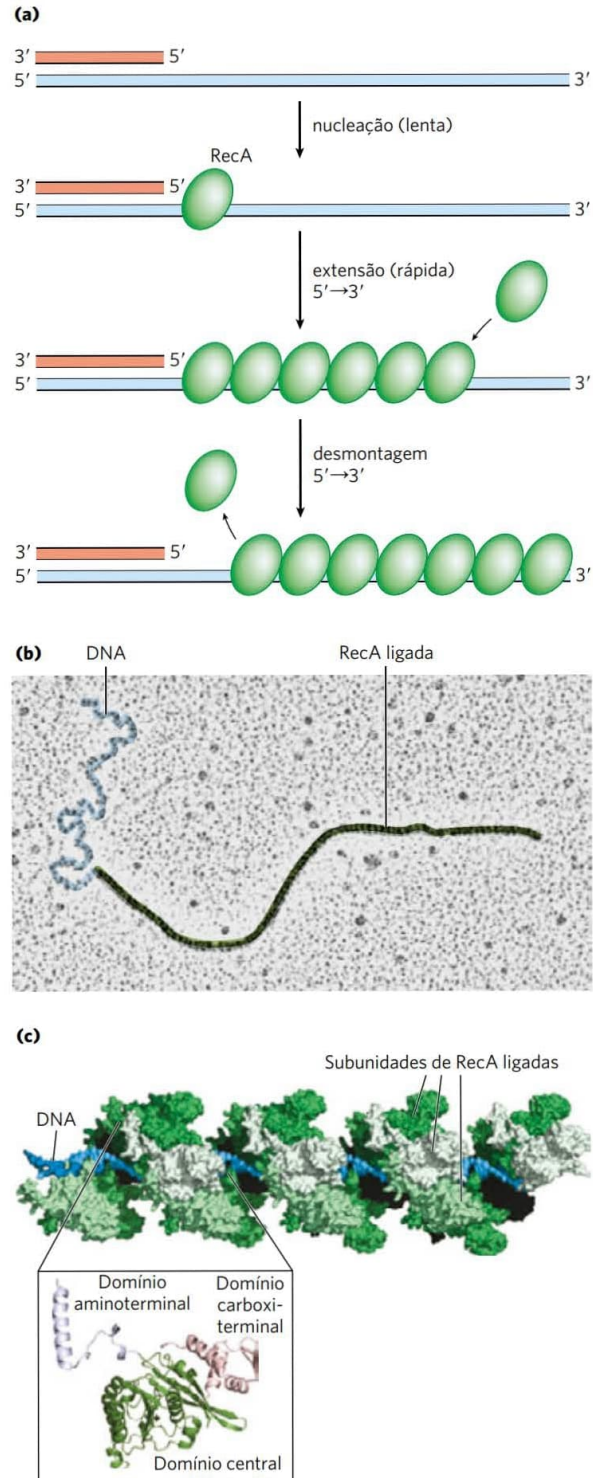
A recombinase bacteriana é a proteína RecA. Ela é incomum entre as proteínas de metabolismo do DNA porque sua forma ativa é um filamento helicoidal ordenado de até vários milhares de subunidades que se reúnem cooperativamente no DNA (**Figura 25-32**). Esse filamento, em geral, forma um DNA de fita simples, como o produzido pela enzima RecBCD. Sua formação não é tão direta como mostrado na Figura 25-32, uma vez que a proteína ligadora da fita simples de DNA (SSB) está normalmente presente e impede especificamente a ligação das primeiras poucas subunidades ao DNA (nucleação do filamento). A enzima RecBCD age diretamente como uma carregadora de RecA, facilitando a nucleação de um filamento de RecA na fita simples de DNA revestida por SSB. Os filamentos se montam e desmontam predominantemente na direção 5'→3'. Muitas outras proteínas bacterianas regulam a formação e a desmontagem de filamentos de RecA. A proteína RecA promove as etapas centrais da recombinação homóloga, incluindo a etapa de invasão da fita de DNA da Figura 25-30, assim como outras reações de troca de fitas que ocorrem *in vitro*.

Após a invasão da fita, a migração do ramo é promovida por um complexo denominado RuvAB (**Figura 25-33a**). Uma vez que um intermediário de Holliday tenha sido criado, ele pode ser clivado por nucleases especializadas, denominadas RuvC (**Figura 25-33b**), e fissuras são seladas pela DNA-ligase. Uma estrutura de forquilha de replicação viável é, então, reconstruída, como destacado na Figura 25-30.

Depois que as etapas de recombinação estão completas, as forquilhas de replicação se reconstróem em um processo denominado **reinício da replicação independente de origem**. Quatro proteínas (PriA, PriB, PriC e DnaT) interagem com DnaC para carregar a DnaB-helicase para a forquilha de replicação reconstruída. A primase DnaG, então, sintetiza um iniciador de RNA, e a DNA-polimerase se reagrupa com a DnaB para reiniciar a síntese do DNA. Um complexo da PriA, PriB, PriC e DnaT, juntamente com DnaB, DnaC e DnaG, é agora denominado **primossomo de reinício da replicação**. Desse modo, o processo de recombinação está fortemente interligado à replicação. Um processo do metabolismo do DNA apoia o outro.

A recombinação eucariótica homóloga é necessária para segregação adequada de cromossomos durante a meiose

Em eucariotos, a recombinação genética homóloga pode ter várias funções na replicação e na divisão celular, incluindo



o reparo das forquilhas de replicação paradas. A recombinação ocorre com a mais alta frequência durante a **meiose**, o processo pelo qual as células germinativas diploides com dois conjuntos de cromossomos se dividem para produzir gametas haploides (espermatozoides ou óvulos) em animais (esporos haploides em plantas) – cada gameta possuindo apenas um membro de cada par de cromossomos

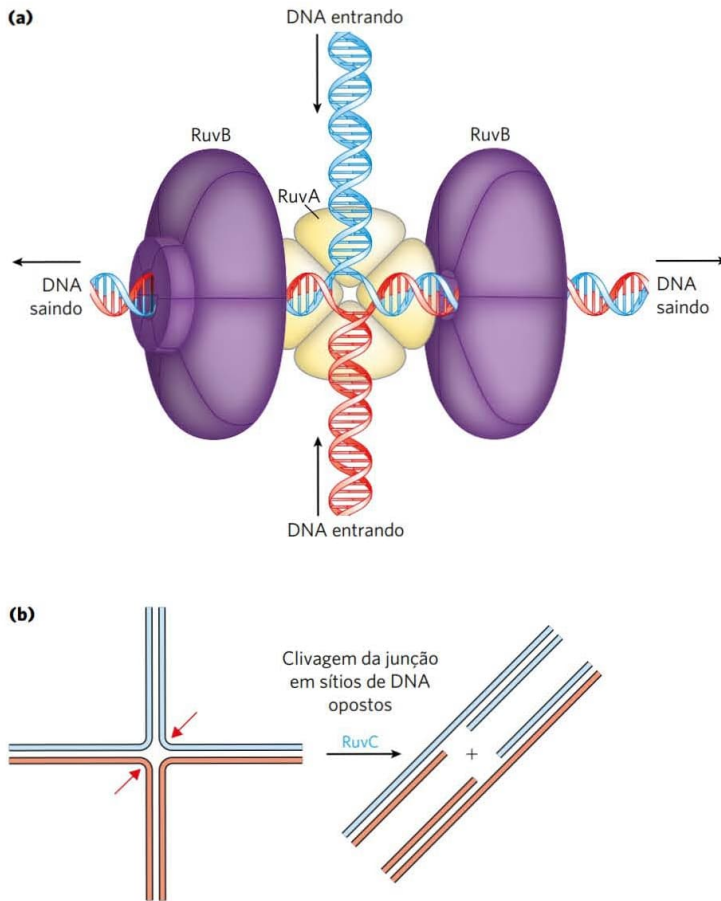
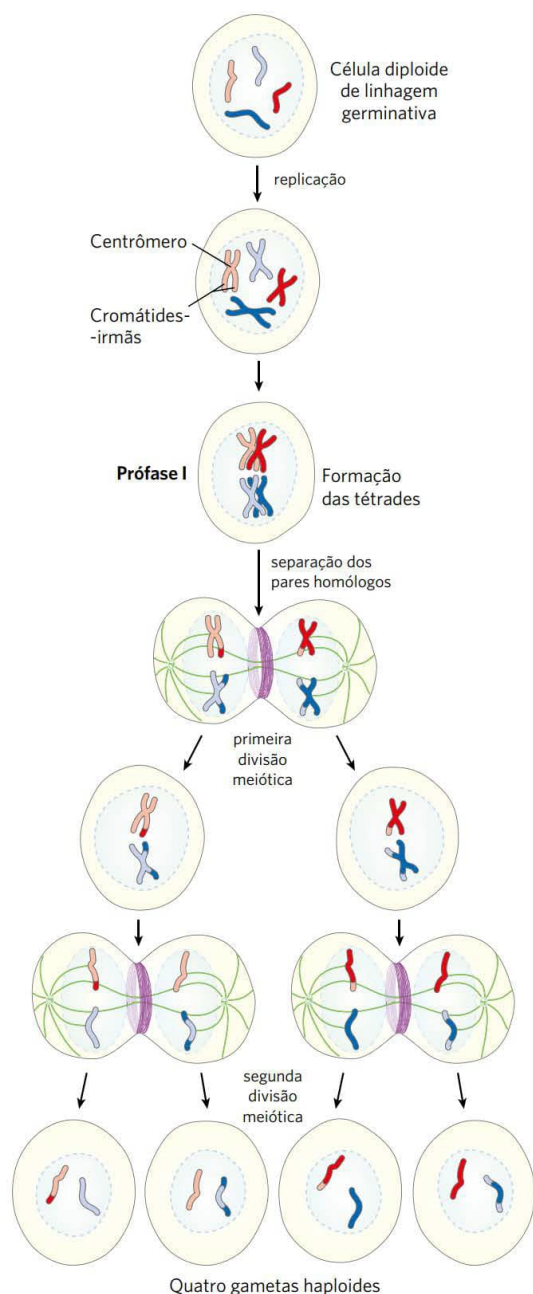


FIGURA 25-33 Catálise da migração do ramo de DNA e resolução do intermediário de Holliday pelas proteínas RuvA, RuvB e RuvC (a) A proteína RuvA liga-se diretamente a um intermediário de Holliday, onde os quatro braços de DNA se encontram. A proteína hexamérica RuvB é uma translocase de DNA. Dois hexâmeros se ligam aos braços opostos do intermediário de Holliday e impulsionam o DNA para fora em uma reação acoplada à hidrólise de ATP e, então, o ramo se move. (b) A RuvC é uma nuclease especializada que se liga ao complexo RuvAB e cliva o intermediário de Holliday nos lados opostos da junção (setas vermelhas), de modo que dois braços contíguos de DNA permanecem em cada produto.

(Figura 25-34). A meiose começa com a replicação do DNA nas células germinativas, de modo que cada molécula de DNA esteja presente em quatro cópias. Cada conjunto de quatro cromossomos homólogos (tétrade) existe como dois pares de cromátides-irmãs, e as cromátides-filhas permanecem associadas nos seus centrômeros. A célula, então, passa por dois ciclos de divisão celular sem uma etapa de replicação do DNA. Na primeira divisão celular, os dois pares de cromátides-irmãs são segregados em células-filhas. Na segunda divisão celular, os dois cromossomos em cada par de cromátides-filhas são segregados em células-filhas novas. Em cada divisão, os cromossomos a serem segregados são levados para as células-filhas pelas fibras do fuso presas a polos opostos da célula em divisão. As duas divisões sucessivas reduzem o conteúdo do DNA ao nível haploide em cada gameta. A segregação adequada de cromossomos para as células-filhas demanda a existência de ligações físicas entre cromossomos homólogos para ser segregada. À medida que as fibras do fuso se prendem aos centrômeros dos cromossomos e começam a puxar, as ligações entre cromossomos homólogos criam uma tensão. Essa tensão, sentida por mecanismos celulares ainda não elucidados, sinaliza que esse par de cromossomos ou cromátides-irmãs está adequadamente alinhado para a segregação. Uma vez que a tensão é percebida, as ligações gradualmente se dissolvem, e a segregação prossegue. Quando ocorre uma ligação inadequada da

fibra ao fuso (p. ex., se os centrômeros de um par de cromossomos estão ligados ao mesmo polo celular), uma cinase celular percebe a ausência de tensão e ativa um sistema que remove as ligações do fuso, permitindo que a célula tente novamente.

Durante a segunda divisão meiótica, as ligações centroméricas entre as cromátides-irmãs, ampliadas por coesinas depositadas durante a replicação (ver Figura 24-33), fornecem as ligações físicas necessárias para guiar a segregação. Entretanto, durante a primeira divisão celular meiótica, os dois pares de cromátides-irmãs que serão segregados não estão relacionados a um evento de replicação recente e não são ligados por coesinas ou por qualquer outra associação física. Ao contrário, os pares homólogos de cromátides-irmãs são alinhados e novas ligações são criadas por recombinação, um processo que envolve a quebra e religação do DNA (**Figura 25-35**). Essa troca, também chamada de entrecruzamento, pode ser observada em microscópio óptico. O entrecruzamento liga os dois pares de cromátides-irmãs juntos em pontos denominados quiasmas. Também durante o entrecruzamento, o material genético é trocado entre pares de cromátides-irmãs. Essas trocas aumentam a diversidade genética nos gametas resultantes. A importância da recombinação meiótica para a segregação cromossômica adequada está bem ilustrada pelas consequências fisiológicas e sociais de suas falhas (Quadro 25-2).



O entrecruzamento não é um processo totalmente aleatório, e “hot spots” têm sido identificados em muitos cromossomos eucarióticos. Entretanto, a suposição de que o entrecruzamento possa ocorrer com a mesma probabilidade em quase todos os pontos ao longo do comprimento de dois cromossomos homólogos continua a ser uma aproximação razoável em muitos casos, e é essa suposição que permite o mapeamento genético dos genes em um cromossomo específico. A frequência de recombinações homólogas em qualquer região que separa dois pontos em um cromossomo é, a grosso modo, proporcional à distância entre dois pontos, o que permite a determinação das posições relativas e das dis-

FIGURA 25-34 Meiose em células de linhagem germinativa em animais. Os cromossomos de uma célula de linhagem germinativa diploide hipotética (quatro cromossomos; dois pares homólogos) replicam e são mantidos juntos pelos seus centrômeros. Cada molécula de DNA de dupla-fita replicada é chamada de cromátide (cromátide-irmã). Na prófase I, logo antes da primeira divisão meiótica, os dois conjuntos homólogos de cromátides se alinham para formar tétrades, mantidas juntas por ligações covalentes nas junções homólogas (quiasmas). As trocas cruzadas ocorrem no interior dos quiasmas (ver Figura 25-35). Essas associações transitórias entre homólogos garantem que dois cromossomos presos se separem adequadamente na próxima etapa, quando as fibras do fuso presas os puxam para polos opostos da célula em divisão na primeira divisão meiótica. Os produtos dessa divisão são duas células-filhas, cada uma com dois pares de cromátides-irmãos diferentes. Os pares agora se alinham ao longo do equador da célula em preparação para a separação das cromátides (agora chamadas de cromossomos). A segunda divisão meiótica produz quatro células-filhas haploides que podem servir como gametas. Cada uma tem dois cromossomos, metade do número da célula diploide da linhagem germinativa. Os cromossomos foram reorganizados e recombinados.

tâncias entre genes diferentes. A distribuição independente dos genes não ligados em cromossomos diferentes (**Figura 25-36**) faz outra importante contribuição para a diversidade genética dos gametas. Essas realidades genéticas orientam muitas das modernas aplicações da genômica, como a definição de haplótipos (ver Figura 9-28) ou a pesquisa para genes de doenças no genoma humano (ver Figura 9-32).

A recombinação homóloga tem, portanto, pelo menos três funções identificáveis em eucariotos: (1) contribui para o reparo de vários tipos de dano ao DNA; (2) fornece, nas células eucarióticas, uma ligação física transitória entre cromátides que promovem a segregação ordenada de cromossomos na primeira divisão celular meiótica; e (3) potencializa a diversidade genética em uma população.

A recombinação durante a meiose se inicia com quebras na dupla-fita

Uma via provável para a recombinação homóloga durante a meiose é destacada na Figura 25-35a. O modelo tem quatro características-chave. Primeiro, os cromossomos homólogos se alinham. Segundo, uma quebra na dupla-fita da molécula de DNA é criada e, então, as extremidades expostas são processadas por uma exonuclease, deixando uma extensão de fita simples com um grupo 3'-hidroxila na extremidade quebrada (etapa 1). Terceiro, as extremidades 3' expostas invadem o DNA dúplice intacto do homólogo, seguido pela migração de ramos e/ou replicação para criar um par de intermediários de Holliday (etapas 2 a 4). Quarto, a clivagem de duas permutas cria qualquer um dos dois pares de produtos recombinantes completos (etapa 5). Observe a semelhança dessas etapas em relação aos processos de reparo bacteriano por recombinação destacados na Figura 25-30.

Nesse **modelo de reparo da quebra da dupla-fita** para recombinação, as extremidades 3' são utilizadas para iniciar a troca genética. Uma vez pareada com a fita complementar no homólogo intacto, é criada uma região do DNA híbrido que contém fitas complementares de dois DNA parentais diferentes (o produto da etapa 2 na Figura 25-35a).

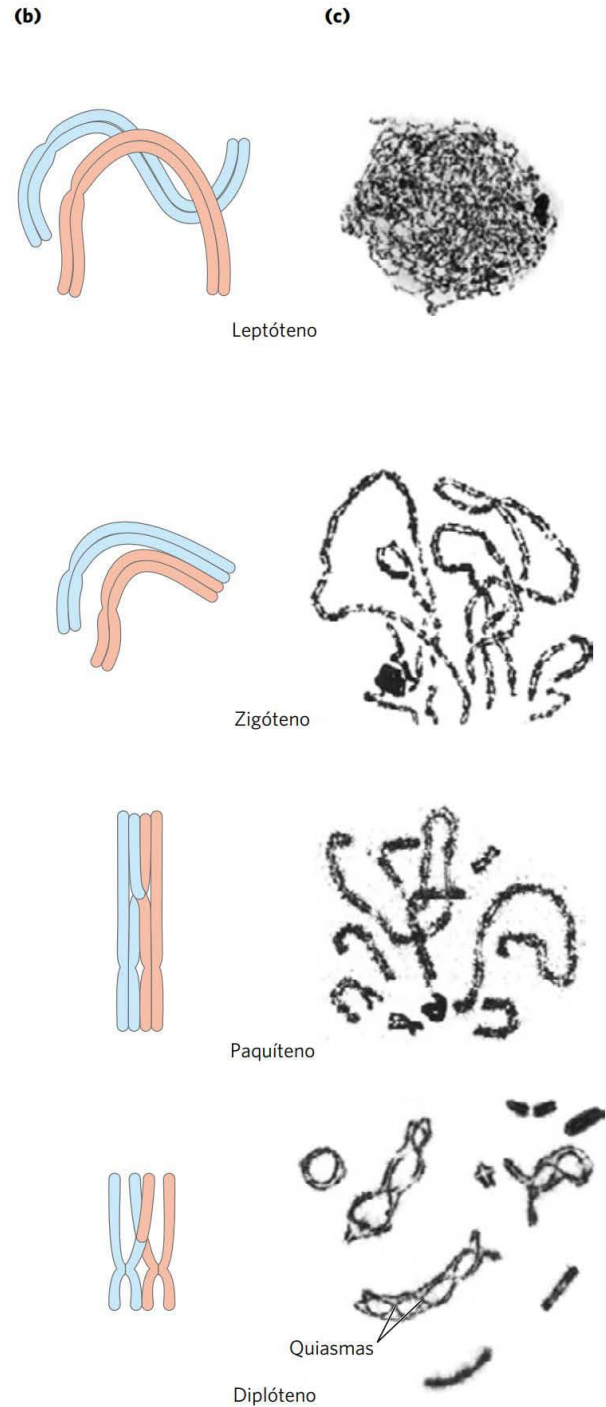
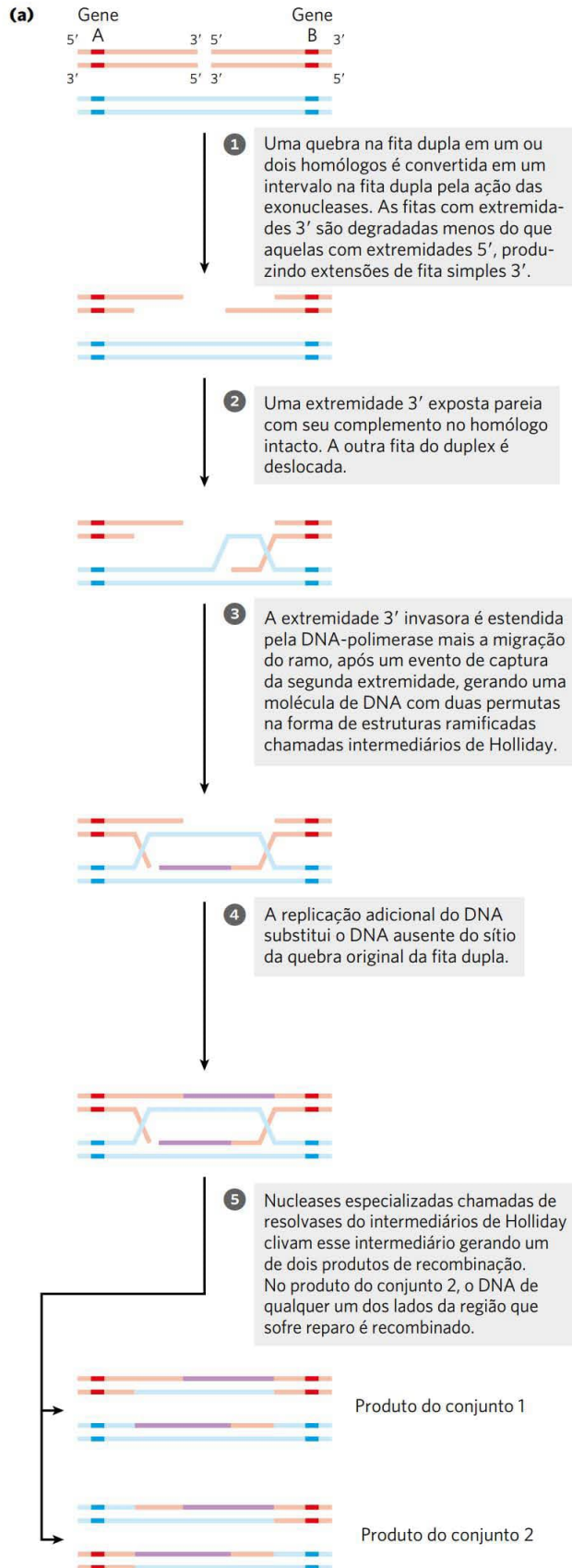


FIGURA 25-35 Recombinação durante a prófase I na meiose. (a) Modelo do reparo de quebra da dupla-fita por recombinação genética homóloga. Os dois cromossomos homólogos (um mostrado em cor salmão, o outro em azul) envolvidos nesse evento de recombinação têm sequências idênticas ou quase idênticas. Cada um dos dois genes mostrados tem diferentes alelos nos dois cromossomos. As etapas estão descritas no texto. (b) O entrecruzamento ocorre durante a prófase da meiose I. Os vários estágios da prófase I estão alinhados com o processo de recombinação mostrado em (a). As quebras de dupla-fita são introduzidas e processadas no estágio de leptóteno. A invasão da fita e a conclusão do entrecruzamento ocorrem mais tarde. À medida que as sequências homólogas nos dois pares de cromátides-irmãs são alinhadas no estágio de zigóteno, formam-se os complexos sinaptonemais e ocorre a invasão da fita. Os cromossomos homólogos são fortemente alinhados no estágio de paquíteno. (c) Cromossomos homólogos de um gafanhoto são vistos em sucessivos estágios da prófase I meiótica. Os quiasmas tornam-se visíveis no estágio de diplóteno. [Fonte: (c) B. John, *Meiosis*, Figs 2.1a, 2.2a, 2.2b, 2.3a, Cambridge University Press, 1990. Reimpressa, com permissão, da Cambridge University Press.]

QUADRO 25-2**MEDICINA****Por que a segregação adequada de cromossomos é importante?**

Quando o alinhamento cromossômico e a recombinação não são corretos e completos na meiose I, a segregação dos cromossomos pode dar errado. Um resultado pode ser a aneuploidia, uma condição na qual uma célula tem o número errado de cromossomos. Os produtos haploides da meiose (gametas ou esporos) podem não ter cópias ou ter duas cópias de um cromossomo. Quando um gameta com duas cópias de um cromossomo se junta com um gameta com uma cópia de um cromossomo durante a fertilização, as células no embrião resultante têm três cópias daquele cromossomo (eles são trissômicos).

Em *S. cerevisiae*, a aneuploidia resultante de erros na meiose ocorre em uma taxa de 1 em cada 10 mil eventos meióticos. Nas moscas-das-frutas, a taxa é de cerca de 1 em poucos milhares. Taxas de aneuploidia em mamíferos são consideravelmente mais altas. Em camundongos, a taxa é de 1 em 100, e é maior ainda em outros mamíferos. A taxa de aneuploidia em óvulos humanos fertilizados é estimada em 10 a 30%; a maioria dessas células aneuploides é monossômica (elas têm uma única cópia de um cromossomo) ou trissômica. É quase certo que essa taxa esteja subestimada. A maior parte das trissomias é letal, e várias resultam em abortos bem antes que a gravidez seja detectada. Quase todas as monossomias são fatais no estágio inicial do desenvolvimento fetal. A aneuploidia é a principal causa de aborto. Os poucos fetos trissômicos que sobrevivem ao nascimento geralmente têm três cópias dos cromossomos 13, 18, ou 21 (a trissomia do 21 é a síndrome de Down). Complementos anormais dos cromossomos sexuais também são encontrados na população humana. As consequências sociais da aneuploidia em seres humanos são consideráveis. A aneuploidia é a principal causa genética de deficiências intelectual e de desenvolvimento. No centro dessas taxas elevadas está uma característica da meiose em fêmeas de mamíferos que tem um significado especial para os seres humanos.

Em seres humanos do sexo masculino, as células germinativas iniciam a meiose na puberdade, e cada evento meiótico necessita de um tempo relativamente curto. Por outro lado, a meiose nas células germinativas das mulheres é um processo muito prolongado. A produção de um óvulo começa antes do nascimento da menina – com o início da meiose no feto, com 12 a 13 semanas de gestação. A meiose inicia-se em todas as células germinativas em desenvolvimento em um período de poucas semanas. As células prosseguem por grande parte da meiose I. Os cromossomos alinham-se e geram permutas, continuando um pouco além da fase de paquíteno (ver Figura 25-35) – e, então,

o processo cessa. Os cromossomos entram em uma fase estacionária, chamada de estágio dictiático, com cruzamentos posicionados, uma espécie de animação suspensa quando eles permanecem como mulheres maduras, permanecendo, portanto, nessa fase, em geral, por aproximadamente 13 a 50 anos. Na maturidade sexual, células germinativas individuais continuam através de duas divisões celulares meióticas para produzir óvulos.

Entre o início do estágio dictiático e a conclusão final da meiose, alguma coisa pode acontecer que interrompe ou danifica os cromossomos homólogos ligados nas células germinativas. Com o aumento da idade da mulher, a taxa de trissomia nos óvulos produzidos aumenta consideravelmente quando ela se aproxima da menopausa (Figura Q-1). Há muitas hipóteses para explicar isso, e vários fatores diferentes podem desempenhar um papel. Entretanto, a maioria das hipóteses está centrada nas trocas por recombinação na meiose I e sua estabilidade durante o estágio dictiático prolongado.

Ainda não está claro quais procedimentos médicos poderiam ser tomados para reduzir a incidência de aneuploidias em fêmeas em idade fértil. O que é conhecido é a importância inerente da recombinação e da geração de permutas na meiose humana.

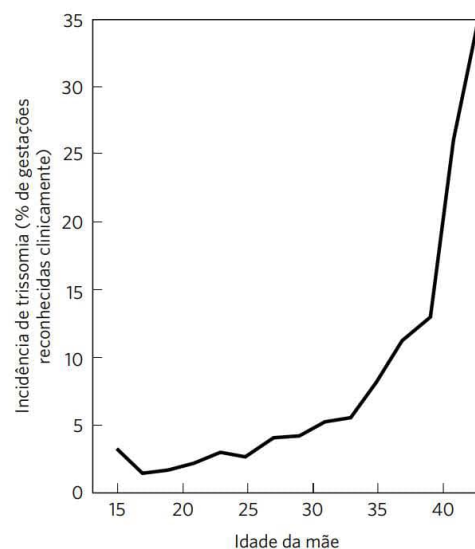


FIGURA Q-1 Incidência cada vez maior da trissomia humana com o aumento da idade da mãe. [Fonte: dados de T. Hassold e P. Hunt, *Nature Rev. Genet.* 2:280, 2001, Fig. 6.]

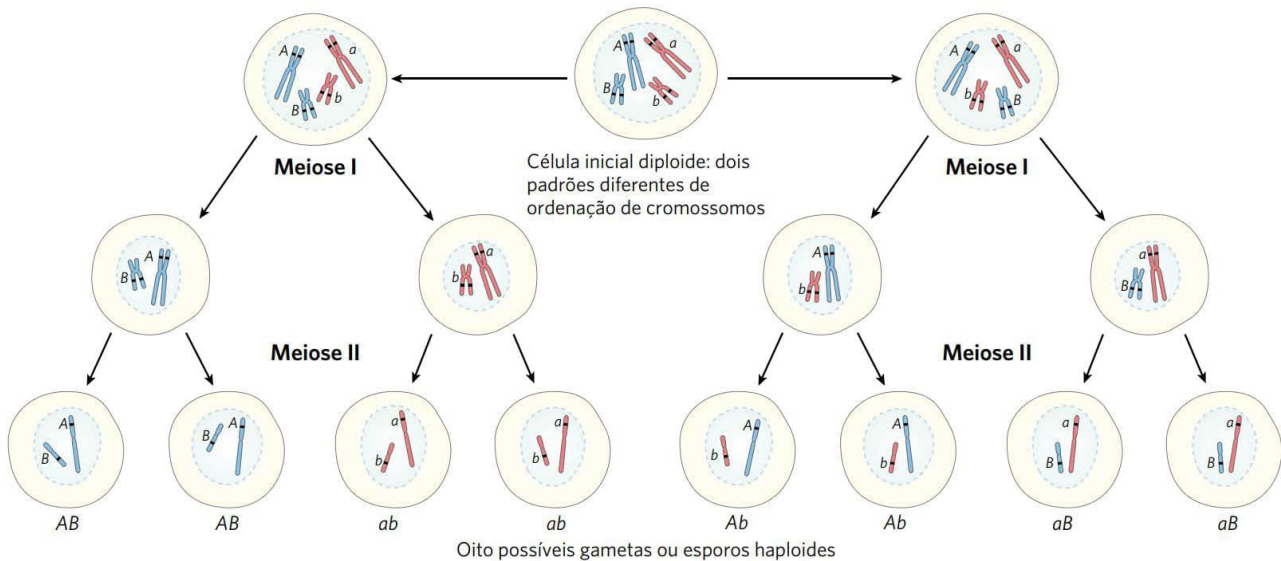


FIGURA 25-36 A contribuição do arranjo independente para a diversidade genética. Nesse exemplo, os dois cromossomos já foram replicados para criar dois pares de cromátides-irmãos. Azul e vermelho distinguem as cromátides-irmãs de cada par. Um gene em cada cromossomo está em destaque, com diferentes alelos (*A* ou *a*, *B* ou *b*) nos homólogos. A ordenação independente pode levar a gametas com qualquer combinação de alelos presente nos dois cromossomos diferentes. O entrecruzamento (não mostrado aqui; ver Figura 25-34) também contribuiria para a diversidade genética em uma típica sequência meiótica.

Cada uma das extremidades 3' pode, então, agir como um iniciador para a replicação do DNA. A recombinação meiótica dos homólogos pode variar em muitos detalhes de uma espécie para outra, mas a maior parte das etapas destacadas antes está geralmente presente em alguma forma. Há dois modos para clivar ou “resolver” o intermediário de Holliday com uma nuclease semelhante à RuvC, de modo que os dois produtos contêm genes na mesma ordem linear que nos substratos – os cromossomos originais e não recombinados (etapa 5). Se clivado de uma forma, o DNA flanqueador à região que contém o DNA híbrido não é recombinado; se clivado do outro modo, o DNA flanqueador é recombinado. Ambos os resultados são observados *in vivo*.

A recombinação homóloga ilustrada na Figura 25-35 é um processo muito elaborado, essencial para a segregação precisa do cromossomo. Suas consequências moleculares para a geração da diversidade genética são sutis. Para compreender como esse processo contribui para a diversidade, deve-se ter em mente que os dois cromossomos homólogos que sofrem recombinação não são necessariamente *idênticos*. O arranjo linear dos genes pode ser o mesmo, mas as sequências de bases em alguns dos genes podem ser um pouco diferentes (em alelos diferentes). Em um ser humano, por exemplo, um cromossomo pode conter o alelo para hemoglobina A (hemoglobina normal), ao passo que o outro contém o alelo para a hemoglobina S (a mutação da anemia falciforme). A diferença pode consistir em não mais do que um par de bases em milhões. A recombinação homóloga não modifica o arranjo linear dos genes, mas pode determinar que alelos se ligaram em um único cromossomo e, portanto, foram passados juntos para a próxima geração. A ordenação independente de cromossomos diferentes (Figura 25-36) determina que alelos genéticos de diferentes cromossomos são herdados juntos.

Algumas quebras de dupla-fita são reparadas por união de extremidades não homólogas

Quebras de dupla-fita muitas vezes ocorrem quando o reparo de DNA por recombinação não é viável, assim como durante fases do ciclo celular quando não está ocorrendo replicação e as cromátides-irmãs não estejam presentes. Nesses momentos, um outro caminho é necessário para evitar a morte da célula resultante de um cromossomo quebrado. Essa alternativa é fornecida pela **união de extremidades não homólogas (NHEJ)**. As extremidades do cromossomo quebrado são simplesmente processadas e religadas.

A união de extremidades não homólogas é uma via importante para o reparo de quebra de dupla-fita em todos os eucariotos e também tem sido detectada em algumas bactérias. A importância da NHEJ aumenta com a complexidade genômica, e o processo predomina na maioria dos reparos de quebras de dupla-fita fora da meiose em mamíferos. Em leveduras, a maioria das quebras de dupla-fita é reparada por recombinação e somente poucos por NHEJ. NHEJ é um processo mutagênico, e um genoma menor, como o de leveduras, tem relativamente pouca tolerância para a perda de informação. Alterações genômicas pequenas podem ser toleradas em células somáticas em mamíferos, uma vez que elas estão balanceadas por informações não danificadas no homólogo em cada célula diploide, e, nessas células não germinativas, as mutações não são hereditárias. Em vertebrados, a perda dos genes que codificam a função de NHEJ pode produzir predisposição a câncer.

Ao contrário do reparo por recombinação homóloga, NHEJ não conserva a sequência de DNA original. A via metabólica em eucariotos está ilustrada na **Figura 25-37**.

A reação inicia nas extremidades rompidas de quebras de dupla-fita pela ligação de um heterodímero consistindo de proteínas Ku70 e Ku80 ("KU" sendo as iniciais do indivíduo com escleroderma, cujos autoanticorpos séricos foram usados para identificar esse complexo proteico; os números referem-se ao peso molecular aproximado das subuni-

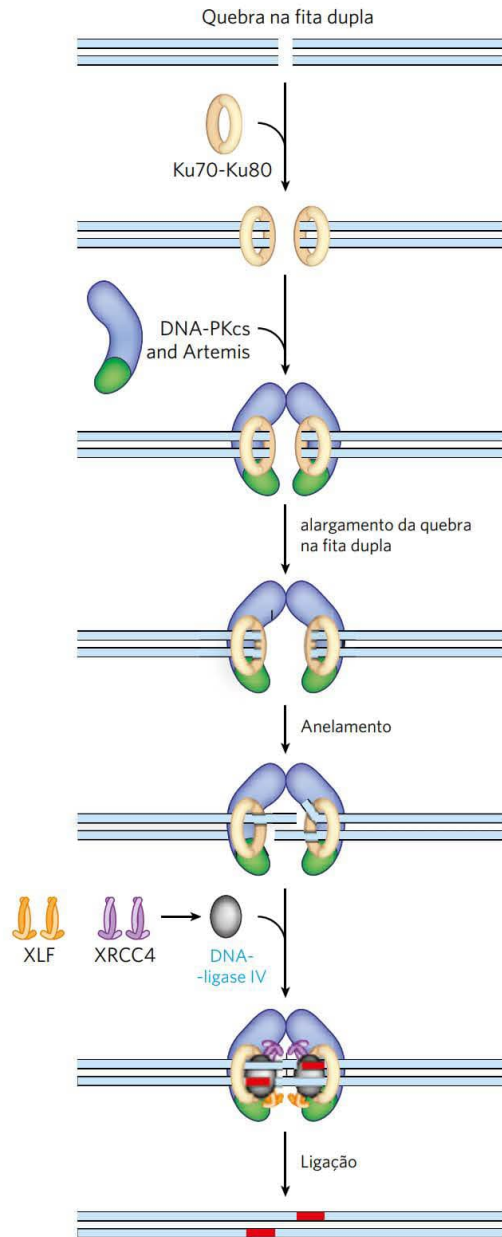


FIGURA 25-37 União de extremidades não homólogas. O complexo Ku70-Ku80 é o primeiro a se ligar às extremidades do DNA, seguido pelo complexo incluindo DNA-PKcs e a nucleotase Artemis. Essas proteínas, então, recrutam um complexo consistindo de XRCC4, XLF e DNA-ligase IV. Uma das duas DNA-polimerases, Pol μ ou Pol λ (não mostrada), subsequentemente estende as fitas de DNA aneladas, como necessário, antes da ligação. [Fonte: informação de J. M. Sekiguchi e D. O. Ferguson, *Cell* 124:260, 2006, Fig. 1.]

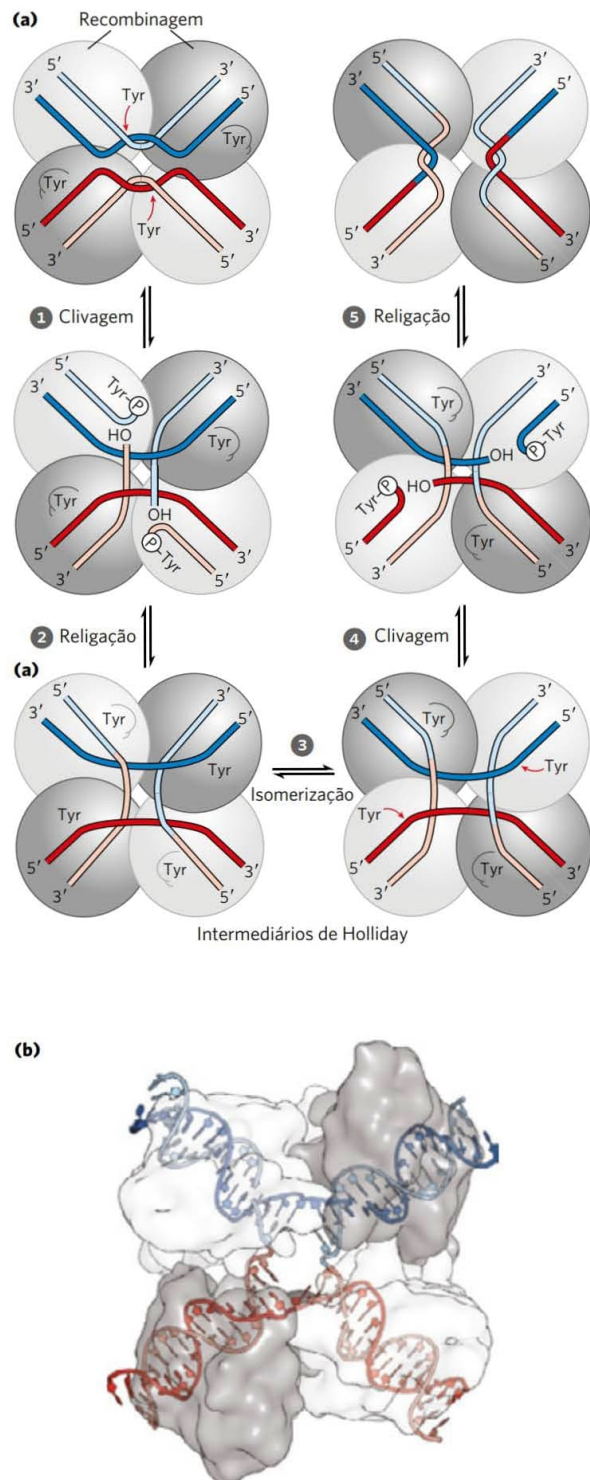
dades). As proteínas Ku são conservadas em quase todos os eucariotos e agem como um tipo de esqueleto molecular para montagem de outros componentes proteicos. Ku70-Ku80 interage com outro complexo proteico contendo uma proteína-quinase denominada DNA-PKcs e uma nucleotase conhecida como Artemis. Uma vez que o complexo é montado, as extremidades dos dois DNA quebrados são mantidas juntas. DNA-PKcs se autofosforila em vários locais e fosforila Artemis. Esta, quando fosforilada, adquire uma função de endonucleotase que pode remover extensões 5' ou 3' de fita simples ou grampos que podem estar presentes nas extremidades. As extremidades de DNA são, então, separadas com o auxílio de uma helicase, e as fitas das duas extremidades diferentes são aneladas em locais onde pequenas regiões de complementaridade são encontradas. Artemis cliva quaisquer segmentos de DNA não pareado criados. Pequenos intervalos no DNA são preenchidos pela DNA-polimerase, Pol μ ou Pol λ . Por fim, as fissuras são seladas por um complexo proteico consistindo de XRCC4 (grupo de complementação cruzada de raio X), XLF (fator semelhante ao XRCC4) e DNA-ligase IV.

Extremidades de DNA não são unidas aleatoriamente pela NHEJ. Em vez disso, quando ocorre uma quebra de dupla-fita, as extremidades ficam geralmente restritas pela estrutura da cromatina e, então, permanecem muito próximas. Muitos eventos raros unindo sequências terminais que estão normalmente distantes no cromossomo, ou em cromossomos diferentes, podem ser responsáveis por ocasionais rearranjos genômicos drásticos e geralmente deletérios.

A recombinação sítio-específica resulta em rearranjos de DNA precisos

A recombinação genética homóloga pode envolver quaisquer duas sequências homólogas. O segundo tipo geral de recombinação, a recombinação sítio-específica, é um tipo muito diferente de processo: a recombinação é limitada a sequências específicas. Reações de recombinação desse tipo ocorrem praticamente em cada célula, ocupando funções especializadas que variam muito de uma espécie para outra. Os exemplos incluem a regulação da expressão de alguns genes e a promoção de rearranjos de DNA programados no desenvolvimento embrionário ou nos ciclos de replicação de alguns DNA virais e de plasmídeos. Cada sistema de recombinação sítio-específica consiste em uma enzima, denominada recombinase, e em uma sequência de DNA única e curta (20 a 200 pb), onde a recombinase age (o sítio de recombinação). Uma ou mais proteínas auxiliares podem regular o tempo ou o resultado da reação.

Há duas classes gerais de sistemas de recombinação sítio-específicos, as quais dependem de resíduos de Tyr ou de resíduos de Ser no sítio ativo. Estudos *in vitro* de muitos sistemas de recombinação sítio-específicos na classe tirosina elucidaram alguns princípios gerais, incluindo a via da reação fundamental (**Figura 25-38a**). Várias dessas enzimas foram cristalizadas, revelando detalhes estruturais da reação. Uma recombinase separada reconhece e se liga a cada um dos dois sítios de recombinação em duas moléculas diferentes de DNA ou no mesmo DNA.



Uma fita de DNA de cada sítio é clivada em um ponto específico no interior do sítio e a recombinase liga-se covalentemente ao DNA no sítio de clivagem por meio de uma ligação de fosfotirosina (etapa 1). A ligação transitória proteína-DNA preserva a ligação fosfodiéster que é perdida na clivagem do DNA, de modo que cofatores de alta energia, como o ATP, são desnecessários nas etapas seguintes.

FIGURA 25-38 Uma reação de recombinação sítio-específica.

(a) A reação mostrada aqui é para uma classe comum de recombinases sítio-específicas, chamadas de recombinases da classe das integrases (nomeadas a partir da integrase do bacteriófago λ , a primeira recombinase caracterizada). Essas enzimas usam resíduos de Tyr como nucleófilos no sítio ativo. A reação é levada a cabo no interior de um tetrâmero de subunidades idênticas. As subunidades de recombinase ligam-se a uma sequência específica, o sítio de recombinação. 1 Uma fita em cada DNA é clivada em pontos específicos na sequência. O nucleófilo é o grupo —OH do resíduo de Tyr do sítio ativo e o produto da reunião 2 é uma ligação de fosfotirosina covalente entre proteína e DNA. Depois da isomerização 3, as fitas clivadas ligam-se a novos parceiros, produzindo um intermediário de Holliday. As etapas 4 e 5 completam a reação por um processo semelhante às primeiras duas etapas. A sequência original do sítio de recombinação é regenerada depois de recombinar o DNA que flanqueia o sítio. Essas etapas ocorrem no interior de um complexo de múltiplas subunidades de recombinase que, algumas vezes, incluem outras proteínas não mostradas aqui. (b) Modelo de contorno de superfície de uma recombinase de quatro subunidades da classe das integrases, chamado de recombinase Cre, ligada a um intermediário de Holliday (mostrado como fitas em hélices em azul-claro e azul-escuro). A proteína foi tornada transparente para que o DNA ligado seja visível. Um outro grupo de recombinases, denominadas família resolvase/invertase, usa um resíduo de Ser como nucleófilo no sítio ativo. [Fonte: (b) PDB ID 1P4E, P. A. Rice e Y. Chen, *J. Biol. Chem.* 278:24:800, 2003.]

As fitas de DNA clivadas são religadas a novos parceiros para formar um intermediário de Holliday, com novas ligações fosfodiéster criadas à custa da ligação proteína-DNA (etapa 2). Uma isomerização, então, ocorre (etapa 3), e o processo é repetido em um segundo ponto no interior de cada um dos dois sítios de recombinação (etapas 4 e 5). Nos sistemas que empregam um resíduo de Ser no sítio ativo, ambas as fitas de cada sítio de recombinação são cortadas concomitantemente e religadas aos novos parceiros sem o intermediário de Holliday. Em ambos os tipos de sistemas, a troca é sempre recíproca e precisa, regenerando os sítios de recombinação quando a reação está completa. É possível ver uma recombinase como uma endonuclease e uma ligase sítio-específica em um único pacote.

As sequências dos sítios de recombinação reconhecidas pelas recombinases sítio-específicas são parcialmente assimétricas (não palindrômicas), e os dois sítios de recombinação se alinham na mesma direção durante a reação da recombinase. O resultado depende da orientação e da localização dos sítios de recombinação (Figura 25-39). Se os dois sítios estiverem na mesma molécula de DNA, a reação inverte ou exclui o DNA interveniente, determinada pelo fato de os sítios de recombinação apresentarem direção oposta ou a mesma direção, respectivamente. Se os sítios estão em DNA diferentes, a recombinação é intermolecular; se um ou ambos os DNA são circulares, o resultado é uma inserção. Alguns sistemas de recombinases são altamente específicos para um desses tipos de reações e agem apenas nos sítios com orientações específicas.

A replicação cromossômica completa pode necessitar da replicação sítio-específica. O reparo do DNA recombinante de um cromossomo bacteriano circular, embora essencial, algumas vezes gera subprodutos deletérios. A resolução de um intermediário de Holliday em uma forquilha de replicação por uma nucleasse, como a RuvC, seguida pelo encerramento da replicação, pode dar origem a um de dois produtos: os dois cromossomos monoméricos normais ou um cromossomo di-

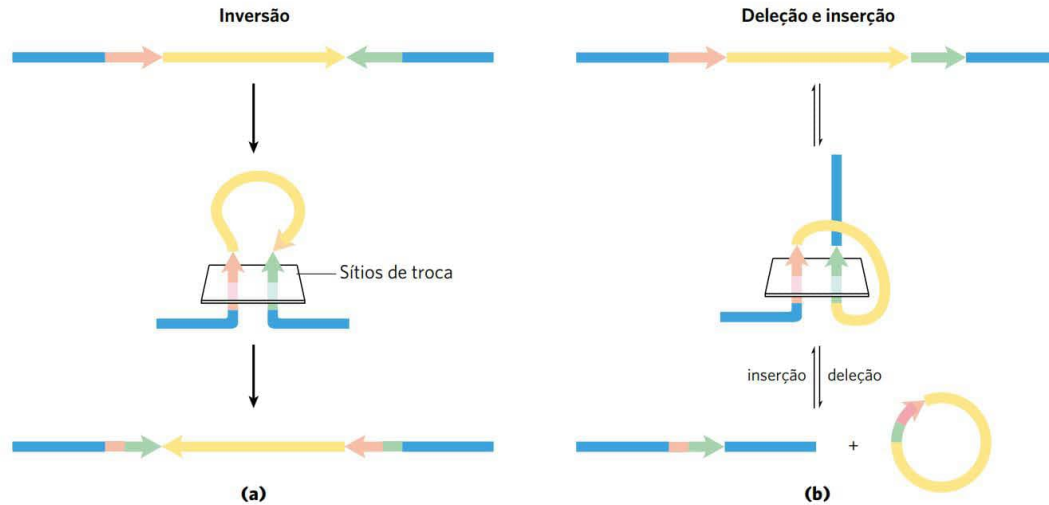


FIGURA 25-39 Efeitos da recombinação sítio-específica. O resultado da recombinação sítio-específica depende da localização e da orientação dos sítios de recombinação (em vermelho e verde) em uma molécula de dupla-fita de DNA. A orientação aqui (mostrada pelas pontas das setas) se refere à ordem dos nucleotídeos no sítio de recombinação, não à direção 5'→3'. **(a)** Sítios de recombinação com orientação oposta na mesma molécula de DNA. O resultado é uma inversão. **(b)** Sítios de recombinação com a mesma orientação, tanto em uma molécula de DNA, produzindo uma deleção, quanto em duas moléculas de DNA, produzindo uma inserção.

mérico contíguo (**Figura 25-40**). No último caso, os cromossomos ligados covalentemente não podem ser segregados para células-filhas na divisão celular, e as células divididas ficam “emperradas”. Um sistema de recombinação sítio-específico especializado em *E. coli*, o sistema XerCD, converte os cromossomos diméricos em cromossomos monoméricos, de modo que a divisão celular prossiga. A reação é uma deleção sítio-específica (**Figura 25-39b**). Esse é outro exemplo da coordenação próxima entre os processos de recombinação do DNA e outros aspectos do metabolismo do DNA.

Elementos genéticos de transposição movem-se de um local para outro

Agora, será abordado o terceiro tipo geral de sistema de recombinação: a recombinação que permite o movimento de elementos de transposição, ou **transposons**. Esses elementos do DNA, encontrados praticamente em todas as células, movem-se ou “pulam” (“*jump*”), de um local no cromossomo (o sítio doador) para outro no mesmo cromossomo ou em um cromossomo diferente (o sítio-alvo). Não é necessária uma sequência de DNA homóloga para esse movimento, denominado **transposição**; a nova localização é determinada mais ou menos aleatoriamente. A inserção de um transposon em um gene essencial poderia matar a célula, assim a transposição é fortemente regulada e normalmente muito infrequente. Os transposons são, talvez, o mais simples dos parasitas moleculares, adaptados para replicar passivamente dentro de cromossomos de células

hospedeiras. Em alguns casos, eles transportam genes úteis para a célula hospedeira e, portanto, existem em um tipo de simbiose com o hospedeiro.



As bactérias têm duas classes de transposons. As **sequências de inserção** (transposons simples) contêm apenas as sequências necessárias para a transposição e os genes para as proteínas (transposases) que promovem o

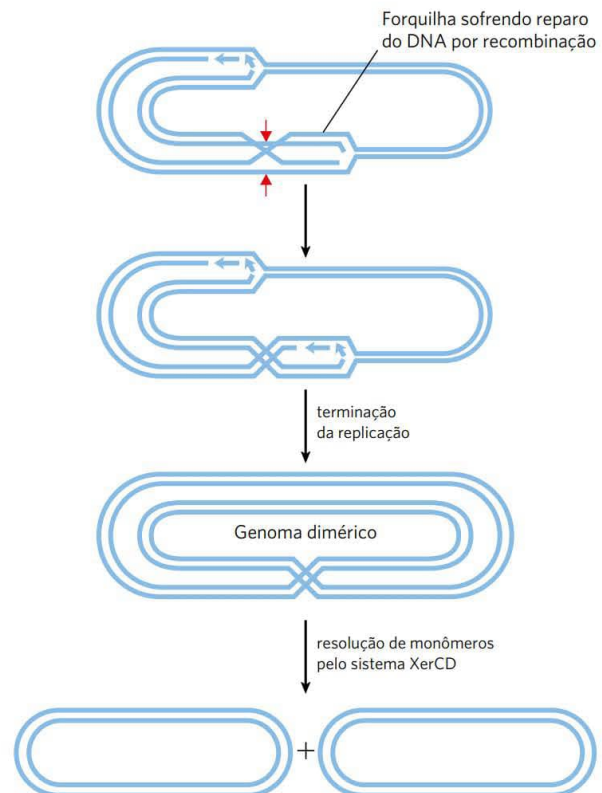


FIGURA 25-40 Deleção do DNA para desfazer um efeito deletério do reparo de DNA por recombinação. A resolução de um intermediário de Holliday durante o reparo de DNA por recombinação (se cortado nos pontos indicados pelas setas vermelhas) pode gerar um cromossomo dimérico contíguo. Uma recombinase sítio-específica especializada em *E. coli*, XerCD, converte o dímero em monômeros, permitindo o prosseguimento da segregação de cromossomos e da divisão celular.

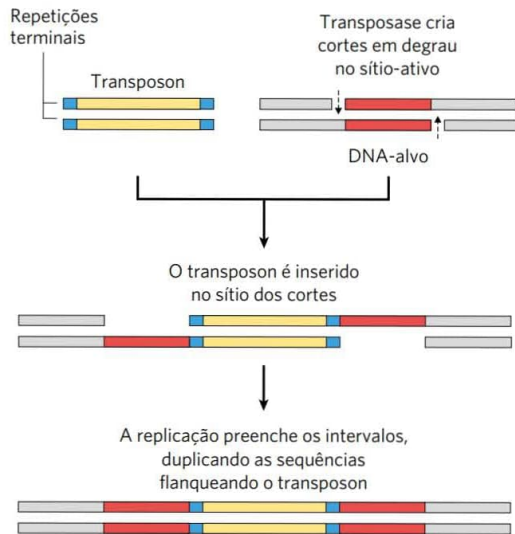


FIGURA 25-41 Duplicação da sequência de DNA em um sítio-alvo quando um transposon é inserido. As sequências duplicadas após a inserção de transposon estão em vermelho. Essas sequências têm geralmente apenas algumas poucas bases de comprimento, e, assim, seu tamanho em relação àquele de um típico transposon é muito exagerado nesse desenho.

processo. Os **transposons complexos** contêm um ou mais genes além daqueles necessários para a transposição. Esses genes extras podem, por exemplo, conferir resistência a antibióticos e, portanto, aumentar as chances de sobrevivência da célula hospedeira. A propagação de elementos de resistência a antibióticos entre populações bacterianas causadoras de doenças, que está tornando alguns antibióticos ineficazes (p. 959), é mediada em grande parte pela transposição. ■

Os transposons bacterianos variam em estrutura, mas a maioria tem sequências repetidas curtas em cada extremidade que funcionam como sítios de ligação para a transposase. Quando ocorre a transposição, uma sequência curta no sítio-alvo (5 a 10 pb) é duplicada para formar uma sequência repetitiva curta adicional que fica ao lado de cada extremidade do transposon inserido (**Figura 25-41**). Esses segmentos duplicados resultam do mecanismo de corte utilizado para inserir um transposon no DNA em uma nova localização.

Há duas vias gerais para a transposição em bactérias. Na transposição direta (ou simples) (**Figura 25-42**, à esquerda), cortes de cada lado do transposon o removem, e ele,

então, move-se para uma nova localização. Isso deixa uma quebra na dupla-fita do DNA doador que deve ser reparada. No sítio-alvo, é feito um corte em degrau (como na **Figura 25-41**), o transposon é inserido na quebra e a replicação do DNA preenche os espaços para duplicar a sequência do sítio-alvo. Na transposição replicativa (**Figura 25-42**, à direita), o transposon inteiro é replicado, deixando uma cópia para trás no local doador. Um **cointegrado** é um intermediário nesse processo, consistindo em uma região doadora covalentemente ligada ao DNA no sítio-alvo. Duas cópias

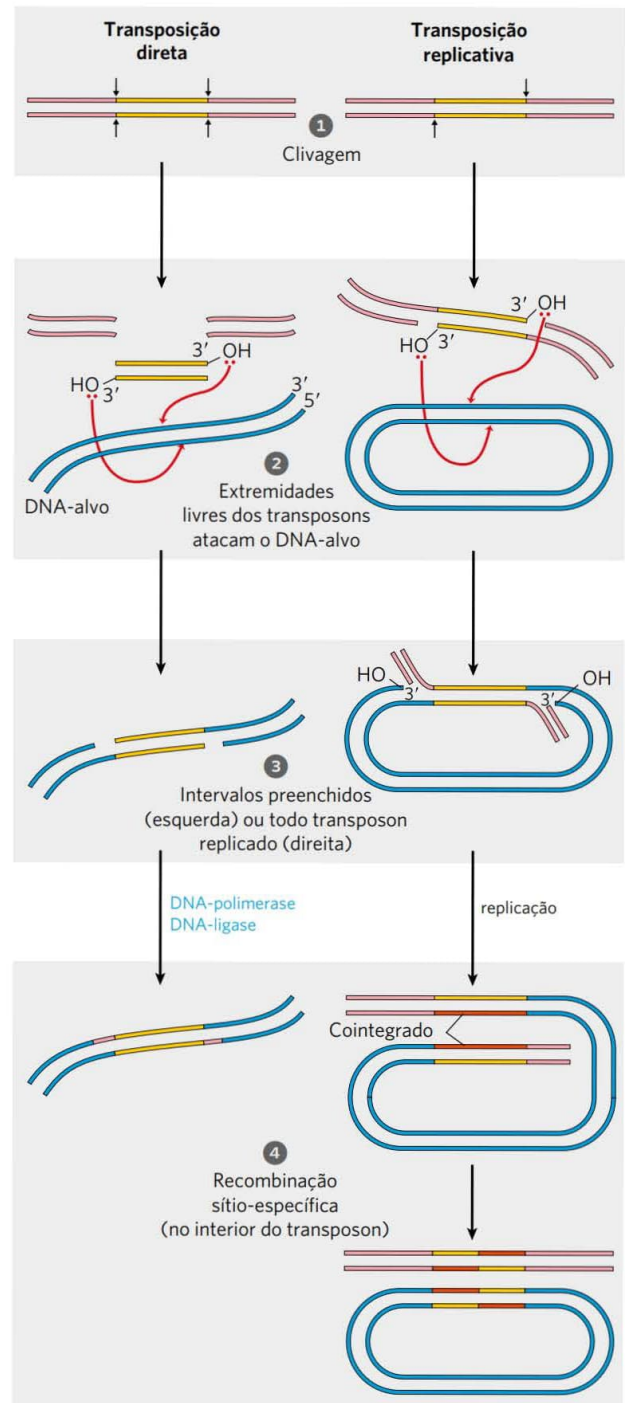


FIGURA 25-42 Duas vias gerais para a transposição: direta (simples) e replicativa. ① O DNA é primeiro clivado de cada lado do transposon, nos sítios indicados pelas setas. ② Os grupos 3'OH liberados nas extremidades do transposon atuam como nucleófilos em um ataque direto sobre as ligações fosfodiéster no DNA-alvo. As ligações fosfodiéster-alvo são escalonadas (não diretamente em frente da outra) nas duas fitas de DNA. ③ O transposon é agora ligado ao DNA-alvo. Na transposição direta (à esquerda), a replicação preenche os intervalos em cada extremidade para completar o processo. Na transposição replicativa (à direita), todo o transposon é replicado para criar um intermediário cointegrado. ④ O cointegrado é frequentemente resolvido posteriormente, com o auxílio de um sistema de recombinação sítio-específico separado. O DNA hospedeiro clivado deixado para trás após transposição direta é reparado pela união de extremidades ou degradado (não mostrado); o último resultado pode ser letal para um organismo.

completas do transposon estão presentes no cointegrado, ambas com a mesma orientação em relação ao DNA. Em alguns transposons bem caracterizados, o cointegrado intermediário é convertido em produtos pela recombinação sítio-específica, na qual recombinases especializadas promovem a reação de deleção necessária.

Os eucariotos também têm transposons, estruturalmente semelhantes aos transposons bacterianos, e alguns utilizam mecanismos de transposição semelhantes. Em outros casos, entretanto, o mecanismo de transposição parece envolver um intermediário de RNA. A evolução desses transposons é interligada à evolução de algumas classes de vírus de RNA. Ambas estão descritas no próximo capítulo. Como ilustrado na Figura 9-27, quase metade do genoma humano é formado por vários tipos de elementos de transposição.

Os genes de imunoglobulinas se reúnem por recombinação

Alguns rearranjos de DNA são uma parte programada do desenvolvimento em organismos de eucariotos. Um exemplo importante é a geração de genes completos de imunoglobulinas a partir de segmentos de genes separados em genomas de vertebrados. Um ser humano (como outros mamíferos) é capaz de produzir *milhões* de imunoglobulinas diferentes (anticorpos) com especificidades de ligação distintas, embora o genoma humano contenha apenas aproximadamente 20 mil genes. A recombinação permite que um organismo

produza uma diversidade extraordinária de anticorpos a partir de uma limitada capacidade de DNA codificante. Estudos sobre o mecanismo de recombinação revelam uma relação próxima à transposição do DNA e sugerem que esse sistema para geração de diversidade de anticorpos pode ter evoluído a partir de uma invasão celular antiga de transposons.

É possível utilizar os genes humanos que codificam proteínas da classe da imunoglobulina G (IgG) para ilustrar como a diversidade de anticorpos é gerada. As imunoglobulinas consistem em duas cadeias polipeptídicas pesadas e em duas leves (ver Figura 5-21). Cada cadeia tem duas regiões, uma região variável, com uma sequência que varia muito de uma imunoglobulina para outra, e uma região praticamente constante dentro de uma classe de imunoglobulinas. Há também duas famílias diferentes de cadeias leves, kappa e lambda, que diferem um pouco nas sequências de suas regiões constantes. Para os três tipos de cadeias polipeptídicas (cadeia pesada e cadeias leves kappa e lambda), a diversidade nas regiões variáveis é gerada por um mecanismo semelhante. Os genes para esses polipeptídeos são divididos em segmentos, e o genoma contém grupos com múltiplas versões de cada segmento. A união de uma versão de cada segmento de gene cria um gene completo.

A **Figura 25-43** retrata a organização do DNA que codifica as cadeias leves kappa da IgG humana e mostra como uma cadeia leve kappa madura é produzida. Em células in-

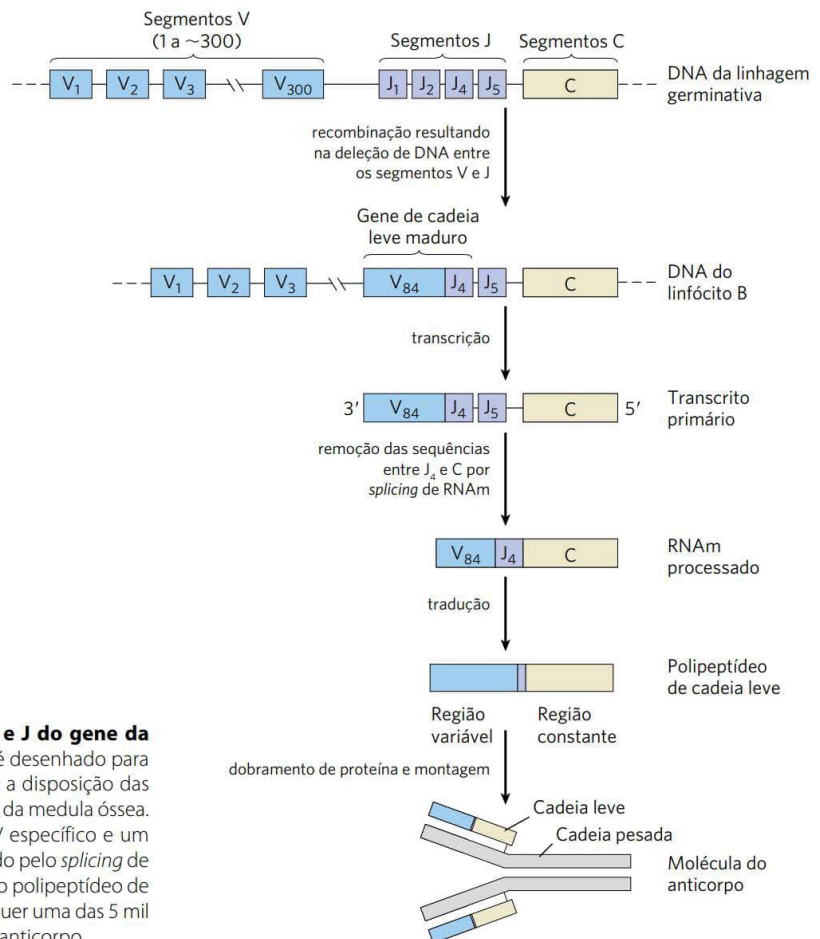


FIGURA 25-43 Recombinação dos segmentos V e J do gene da cadeia leve kappa da IgG humana. Este processo é desenhado para gerar diversidade de anticorpos. No topo, é mostrada a disposição das sequências codificadoras de IgG em uma célula-tronco da medula óssea. A recombinação deleta o DNA entre um segmento V específico e um segmento J. Após a transcrição, o transcrito é processado pelo *splicing* de RNA, como descrito no Capítulo 26; a tradução produz o polipeptídeo de cadeia leve. A cadeia leve pode se combinar com qualquer uma das 5 mil cadeias pesadas possíveis para produzir a molécula de anticorpo.

diferenciadas, a informação codificadora dessa cadeia polipeptídica é separada em três segmentos. O segmento V (variável) codifica os primeiros 95 resíduos de aminoácidos da região variável, o segmento J (união) codifica os 12 resíduos restantes da região variável e o segmento C codifica a região constante. O genoma contém aproximadamente 300 segmentos V diferentes, 4 segmentos J diferentes e 1 segmento C.

À medida que uma célula-tronco na medula óssea se diferencia para formar um linfócito B maduro, um segmento V e um segmento J são reunidos por um sistema de recombinação especializado (Figura 25-43). Durante esta deleção programada do DNA, o DNA interveniente é descartado. Existem cerca de $300 \times 4 = 1.200$ possíveis combinações V-J. O processo de recombinação não é tão preciso como a recombinação sítio-específica descrita anteriormente, de modo que variações adicionais ocorrem na sequência na junção V-J. Isso aumenta a variação total em cerca de pelo menos 2,5 vezes, de modo que as células podem gerar em torno de $2,5 \times 1.200 = 3.000$ combinações V-J diferentes. A junção final da combinação V-J à região C é realizada por uma reação de RNA-splicing após a transcrição, processo descrito no Capítulo 26.

O mecanismo de recombinação para a junção dos segmentos V e J é ilustrado na **Figura 25-44**. Um pouco além de cada segmento V e imediatamente antes de cada segmento J se situam as sequências de sinalização de recombinação (RSS). Estas estão ligadas por proteínas denominadas RAG1 e RAG2 (produtos do gene ativador de recombinação). As proteínas RAG catalisam a formação de uma quebra da dupla-fita entre as sequências de sinalização e os segmentos V (ou J) a serem unidos. Os segmentos V e J são, então, reunidos com o auxílio de um segundo complexo de proteínas.

Os genes para as cadeias pesadas e as cadeias leves lambda são formados por um processo semelhante. As cadeias pesadas possuem mais segmentos de genes que as cadeias leves, com mais de 5 mil combinações possíveis. Como qualquer cadeia pesada pode se combinar com qualquer cadeia leve para gerar uma imunoglobulina, cada ser humano tem, pelo menos, $3.000 \times 5.000 = 1,5 \times 10^7$ IgG possíveis. Diversidade adicional é gerada por altas taxas de mutação (de mecanismo desconhecido) nas sequências V durante a diferenciação do linfócito B. Cada linfócito B maduro produz apenas um tipo de anticorpo, mas a gama de anticorpos produzidos pelos linfócitos B de um indivíduo é claramente enorme.

Terá o sistema imune evoluído, em parte, de transposons antigos? O mecanismo de geração de quebras de dupla-fita por RAG1 e RAG2, de fato, espelha várias etapas de reação na transposição (Figura 25-44). Além disso, o DNA excluído, com seu RSS terminal, tem uma estrutura de sequência encontrada na maioria dos transposons. Em testes em tubos de ensaio, RAG1 e RAG2 podem se associar a esse DNA deletado e inseri-lo, de modo semelhante a um transposon, em outras moléculas de DNA (provavelmente uma reação rara em linfócitos B). Embora não se saiba com certeza, as propriedades do sistema de rearranjo de genes de imunoglobulina sugerem uma origem intrigante, na qual a distinção entre o hospedeiro e o parasita tornou-se turva pela evolução.

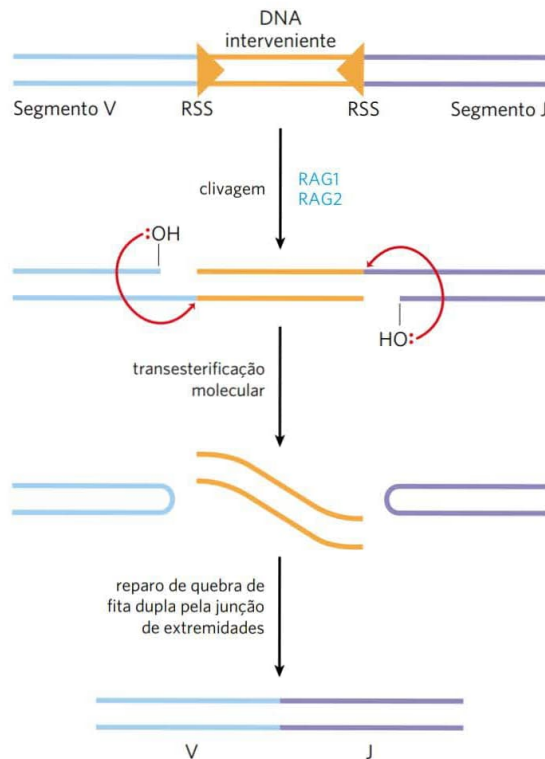


FIGURA 25-44 Mecanismo de rearranjo do gene da imunoglobulina. As proteínas RAG1 e RAG2 ligam-se às sequências de sinalização de recombinação (RSS) e clivam uma fita de DNA entre os segmentos RSS e V (ou J) a serem ligados. A 3'-hidroxila liberada atua, então, como nucleófilo, atacando uma ligação fosfodiéster na outra fita para criar uma quebra de dupla-fita. O grampo resultante se curva, os segmentos V e J são clivados e as extremidades são covalentemente ligadas por um complexo de proteínas especializadas para o reparo de ligação de extremidades de quebras de dupla-fita. As etapas na geração da quebra de dupla-fita catalisadas pelo RAG1 e RAG2 são quimicamente relacionadas a etapas nas reações de transposição.

RESUMO 25.3 Recombinação do DNA

- As sequências de DNA são rearranjadas em reações de recombinação, geralmente em processos fortemente coordenados com a replicação ou o reparo do DNA.
- A recombinação genética homóloga pode acontecer entre duas moléculas de DNA quaisquer que partilhem uma sequência homóloga. Em bactérias, a recombinação funciona principalmente como um processo de reparo do DNA, centrado em reativar forquilhas de replicação paradas ou fechadas, ou no reparo geral de quebras da dupla-fita. Em eucariotos, a recombinação é essencial para assegurar a segregação cromossômica precisa durante a primeira divisão celular meiótica. Ela também ajuda a criar diversidade genética nos gametas resultantes.
- A união de extremidade não homólogas fornece um mecanismo alternativo para o reparo de quebras de dupla-fita, sobretudo em células eucarióticas.

- A recombinação sítio-específica ocorre apenas nas sequências-alvo específicas, e esse processo também pode envolver um intermediário de Holliday. As recombinases clivam o DNA em pontos específicos e ligam as fitas a novos parceiros. Esse tipo de recombinação é encontrado em praticamente todas as células e suas muitas funções incluem a integração do DNA e a regulação da expressão gênica.
- Em praticamente todas as células, os transposons utilizam a recombinação para se moverem dentro ou entre os cromossomos. Em vertebrados, uma reação de recombinação programada relacionada à transposição une segmentos de genes de imunoglobulinas para formar genes de imunoglobulinas durante a diferenciação do linfócito B.

Termos-chave

Termos em negrito estão definidos no glossário.

molde 989	ORC (complexo de reconhecimento de origem) 1004
replicação semiconservativa 989	DNA-polimerase ϵ 1004
forquilha de replicação 990	DNA-polimerase δ 1004
origem 990	DNA-polimerase α 1004
fragmentos de Okazaki 991	reparo de excisão de base 1008
fita-líder 991	DNA-glicosilases 1008
fita tardia 991	sítio AP 1008
nucleases 991	AP endonucleases 1009
exonucleases 991	DNA-fotolases 1010
endonucleases 991	síntese de DNA translesão propensa a erro 1013
DNA-polimerases 991	resposta SOS 1013
DNA-polimerase I 991	recombinação genética homóloga 1016
iniciador (primer) 992	recombinação sítio-específica 1016
terminal do iniciador 992	transposição de DNA 1016
processividade 993	reparo do DNA por recombinação 1017
revisão 993	migração do ramo 1018
DNA-polimerase III 994	intermediário de Holliday 1018
replissomo 995	meiose 1019
helicases 996	modelo de reparo da quebra da dupla-fita 1021
topoisomerases 996	união de extremidades não homólogas (NHEJ) 1024
primases 996	transposon 1027
DNA-ligases 997	transposição 1027
elemento de desenrolamento de DNA (DUE) 997	sequência de inserção 1027
AAA+-ATPases 998	cointegrado 1028
primossomo 999	
catenano 1003	
complexo pré-replicativo (pré-RC) 1003	
licenciamento 1003	
proteínas de manutenção de minicromossomos (MCM) 1003	

Teste seu conhecimento

1. Conclusões a partir do experimento de Meselson-Stahl O experimento de Meselson-Stahl (ver Figura 25-2) provou que em *E. coli*, a replicação do DNA é semiconservativa. No modelo “dispersivo” da replicação do DNA, as fitas parentais de DNA são clivadas em pedaços de tamanhos aleatórios, sendo, então, ligadas a peças do DNA recém-replicado para formar duplexes-filhas. Explique como os resultados do experimento de Meselson e Stahl descartaram esse modelo.

2. Análise de isótopos pesados na replicação do DNA Uma cultura de *E. coli* crescendo em um meio contendo $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ é trocada para um meio contendo $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$ por três gerações (aumento de oito vezes na população). Qual é a razão molar entre o DNA híbrido (^{15}N - ^{14}N) e o DNA leve (^{14}N - ^{14}N) nesse ponto?

3. Replicação do cromossomo de *E. coli* O cromossomo de *E. coli* contém 4.641.652 pares de bases.

- Como as muitas voltas da dupla-hélice devem ser desenroladas durante a replicação do cromossomo de *E. coli*?
- A partir dos dados deste capítulo, quanto tempo levaria para replicar o cromossomo de *E. coli* a 37°C se duas forquilhas de replicação prosseguissem a partir da origem? Suponha que a replicação ocorre a uma taxa de 1.000 pb/s. Sob algumas condições, as células de *E. coli* podem se dividir a cada 20 min. Como isso seria possível?
- Na replicação do cromossomo de *E. coli*, cerca de quantos fragmentos de Okazaki poderiam ser formados? Que fatores garantem que os numerosos fragmentos de Okazaki são reunidos na ordem correta no novo DNA?

4. Composição de bases dos DNA feitos a partir de moldes de fitas simples Preveja a composição de bases do DNA total sintetizado por DNA-polimerase nos moldes fornecidos por uma mistura equimolar de duas fitas complementares do DNA do bacteriófago ϕX174 (molécula de DNA circular). A composição de bases de uma fita é A, 24,7%; G, 24,1%; C, 18,5%; e T, 32,7%. Que pressuposto é necessário para responder a esse problema?

5. Replicação do DNA Kornberg e colaboradores incubaram extratos solúveis de *E. coli* com uma mistura de dATP, dTTP, dGTP e dCTP, todos marcados com ^{32}P no grupo fosfato α . Após um período, a mistura da incubação foi tratada com ácido tricloroacético, que precipita o DNA, mas não os precursores de nucleotídeos. O precipitado foi recolhido e o grau de incorporação dos precursores no DNA foi determinado a partir da quantidade de radioatividade presente no precipitado.

- Se qualquer um dos quatro precursores de nucleotídeos fosse omitido da mistura de incubação, a radioatividade poderia ser encontrada no precipitado? Explique.
- Poderia o ^{32}P ser incorporado no DNA se apenas o dTTP fosse marcado? Explique.
- A radioatividade poderia ser encontrada no precipitado se ^{32}P marcasse o fosfato β ou γ em vez do fosfato α dos desoxirribonucleotídeos? Explique.

6. A química da replicação do DNA Todas as DNA-polimerases sintetizam novas fitas de DNA na direção 5'→3'. Em alguns aspectos, a replicação das fitas antiparalelas do dúplice de DNA poderia ser mais simples se houvesse também um segundo tipo de polimerase, um que sintetizasse o DNA na direção 3'→5'. Os dois tipos de polimerases poderiam, em princípio,

coordenar a síntese do DNA sem os mecanismos complicados necessários para a replicação da fita tardia. Entretanto, não foi encontrada tal enzima de síntese na direção 3'→5'. Sugira dois mecanismos possíveis para a síntese do DNA na direção 3'→5'. O pirofosfato deveria ser um produto de ambas as reações propostas. Um ou ambos os mecanismos podem ser apoiados em uma célula? Sim ou não? Por quê? (Dica: sugira a utilização de precursores do DNA ausentes nas células existentes.)

7. Atividades das DNA-polimerases Você está caracterizando uma nova DNA-polimerase. Quando a enzima é incubada com DNA marcado com [³²P] e sem dNTP, você pode observar a liberação de [³²P]dNMP. Essa liberação é impedida pela adição de dNTP não marcados. Explique as reações que provavelmente mais contribuem para essas observações. O que você esperaria observar se você adicionasse pirofosfato, em vez de dNTP?

8. Fitas líder e tardia Prepare uma tabela que liste os nomes e compare as funções dos precursores, das enzimas e de outras proteínas necessárias para construir a fita-líder *versus* a fita tardia durante a replicação do DNA em *E. coli*.

9. Função da DNA-ligase Alguns mutantes de *E. coli* contêm DNA-ligase defeituosa. Quando esses mutantes são expostos à timina marcada com ³H e o DNA produzido é sedimentado em um gradiente de densidade de sacarose alcalina, duas bandas radioativas aparecem. Uma corresponde à fração de alto peso molecular, a outra à fração de baixo peso molecular. Explique.

10. Fidelidade da replicação do DNA Que fatores promovem a fidelidade da replicação durante a síntese da fita-líder do DNA? Você esperaria que a fita tardia fosse feita com a mesma fidelidade? Explique suas respostas.

11. Importância das DNA-topoisomerases na replicação do DNA O DNA desenrolando, como ocorre na replicação, afeta a densidade super-helicoidal do DNA. Na ausência de topoisomerases, o DNA se tornaria superenrolado à frente da forquilha de replicação, do mesmo modo que atrás dela está o DNA desenrolado. Uma forquilha de replicação bacteriana parará quando a densidade super-helicoidal (σ) do DNA à frente da forquilha atingir +0,14 (ver Capítulo 24).

A replicação bidirecional se inicia na origem de um plasmídeo de 6.000 pb, *in vitro*, na ausência de topoisomerases. O plasmídeo tem inicialmente um σ de -0,06. Quantos pares de bases serão desenrolados e replicados por cada forquilha de replicação antes que a forquilha pare? Suponha que ambas as forquilhas se movimentam na mesma velocidade e que cada uma inclui todos os componentes necessários para o alongamento, exceto a topoisomerase.

12. O teste de Ames Em um meio nutritivo que não tem histidina, uma fina camada de ágar contendo aproximadamente 10⁸ células de *Salmonella typhimurium* auxotróficas para histidina (células mutantes que necessitam de histidina para sobreviver) produz aproximadamente 13 colônias em um período de dois dias de incubação a 37°C (ver Figura 25-20). Como essas colônias surgem na ausência de histidina? O experimento é repetido na presença de 0,4 µg de 2-aminoantraceno. O número de colônias produzidas em dois dias excede 10 mil. O que isso indica a respeito do 2-aminoantraceno? O que você pode prever a respeito de sua carcinogenicidade?

13. Mecanismos de reparo do DNA As células de vertebrados e plantas frequentemente metilam citosina no DNA para formar 5-metilcitosina (ver Figura 8-5a). Nessas mesmas células, um sistema de reparo especializado reconhece malpareamentos G-T e os repara para pares de bases G=C. Como esse sistema de reparo pode ser vantajoso para a célula? (Explique em termos da presença de 5-metilcitosina no DNA.)

14. O custo energético do reparo de malpareamento Em uma célula de *E. coli*, a DNA-polimerase III produz um erro raro e insere uma G do lado oposto a um resíduo de A a 650 pb da sequência GATC mais próxima. O malpareamento é reparado com precisão pelo sistema de reparo de malpareamento. Quantas ligações fosfodiéster derivadas de desoxinucleotídeos (dNTP) são gastas durante esse reparo? As moléculas de ATP também são usadas nesse processo. Qual(is) enzima(s) consome(m) o ATP?



15. Reparo de DNA em pessoas com xeroderma pigmentosa A doença conhecida como xeroderma pigmentosa (XP) é causada por mutações em pelo menos sete diferentes genes humanos (ver Quadro 25-1). As deficiências são, geralmente, em genes que codificam enzimas envolvidas em alguma parte da via de reparo de excisão de nucleotídeos em seres humanos. Os vários tipos de XP são denominados de A até G (XPA, XPB, etc.), com algumas poucas variantes adicionais conhecidas sob a denominação de XP-V.

Culturas de fibroblastos de indivíduos saudáveis e de pacientes com XPG são irradiadas com luz ultravioleta. O DNA é isolado e desnaturado, e as fitas simples de DNA obtidas dessa forma são caracterizadas por ultracentrifugação analítica.

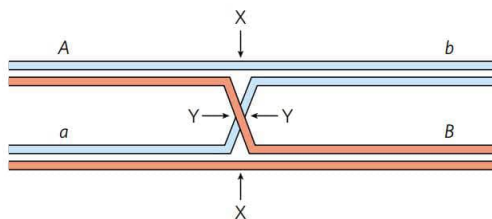
- Amostras de fibroblastos normais mostram uma redução significativa no peso molecular médio das fitas simples de DNA após a irradiação, mas as amostras de fibroblastos XPG não mostram tal redução. Como isso pode ocorrer?
- Se você considerar que o sistema de reparo de excisão de nucleotídeos está operante nos fibroblastos, qual etapa poderá estar defeituosa nas células de pacientes com XPG? Explique.

16. Reparo direto A lesão O⁶-meG é normalmente reparada por transferência direta do grupo metila para a proteína O⁶-metilguanina-DNA-metiltransferase. Para a sequência nucleotídica AAC(O⁶-meG)TGCAC, com um resíduo G danificado (metilado), qual seria a sequência de ambas as cadeias de cada DNA de cadeia dupla resultante da replicação nas seguintes situações?

- A replicação ocorre antes do reparo.
- A replicação ocorre após o reparo.
- Duas rodadas de replicação ocorrem, seguidas de reparo.

17. Intermediários de Holliday Como a formação de intermediários de Holliday na recombinação genética homóloga diferem de sua formação na recombinação sítio-específica?

18. Clivagem dos intermediários de Holliday Um intermediário de Holliday é formado entre dois cromossomos homólogos, em um ponto entre os genes A e B, como mostrado a seguir. Os cromossomos têm alelos diferentes dos dois genes (A e a, B e b). Onde os intermediários de Holliday poderiam ser clivados (pontos X e/ou Y) para gerar um cromossomo que poderia transportar (a) um genótipo Ab ou (b) um genótipo ab?

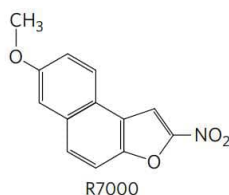


19. Uma conexão entre replicação e recombinação sítio-específica

A maioria das cepas selvagens de *S. cerevisiae* tem cópias múltiplas do plasmídeo de DNA circular 2μ (assim denominado por seu comprimento de cerca de $2\mu\text{m}$), o qual tem aproximadamente 6.300 pb. Para a sua replicação, o plasmídeo utiliza o sistema de replicação do hospedeiro, sob o mesmo controle fino usado para os cromossomos celulares do hospedeiro, replicando apenas uma vez a cada ciclo celular. A replicação do plasmídeo é bidirecional, com ambas as forquilhas de replicação iniciando em uma única origem bem definida. Entretanto, um ciclo de replicação do plasmídeo 2μ pode resultar em mais de duas cópias do plasmídeo, permitindo a amplificação do seu número de cópias (número de cópias de plasmídeos por célula) sempre que a segregação do plasmídeo durante a divisão celular deixa uma célula-filha com menos plasmídeos do que o complemento normal de cópias desse plasmídeo. A amplificação precisa de um sistema de recombinação sítio-específico codificado pelo plasmídeo, o qual serve para inverter uma parte do plasmídeo em relação à outra. Explique como um evento de inversão sítio-específica pode resultar na amplificação do número de cópias do plasmídeo. (Dica: considere a situação quando as forquilhas de replicação duplicam um sítio de recombinação, mas não o outro.)

Problema de análise de dados

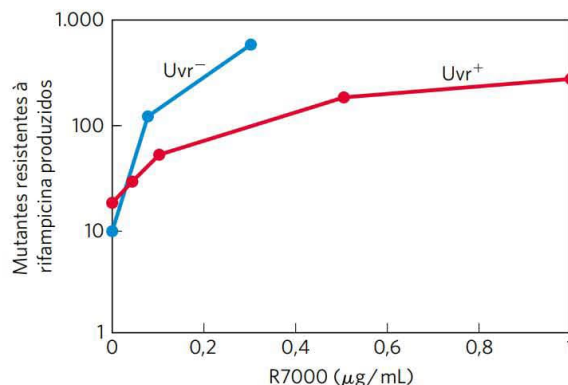
20. Mutagênese em *Escherichia coli* Muitos compostos mutagênicos atuam por meio da alquilação de bases no DNA. O agente alquilante R7000 (7-metoxi-2-nitronafto[2,1-b]furanó) é um agente mutagênico extremamente potente.



In vivo, o R7000 é ativado pela enzima nitro-redutase, e essa forma mais reativa se liga covalentemente ao DNA – principalmente, mas não exclusivamente, a pares de bases G≡C.

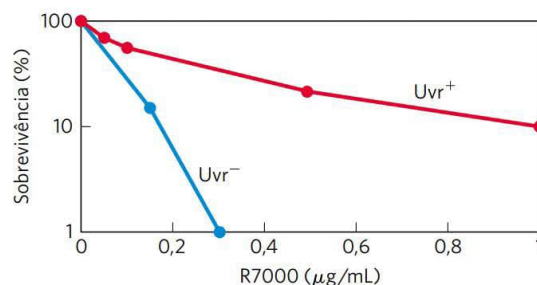
Em um estudo de 1996, Quillardet, Touati e Hofnung investigaram os mecanismos pelos quais o R7000 causa mutações em *E. coli*. Eles compararam a atividade genotóxica do R7000 em duas cepas de *E. coli*: a selvagem (Uvr^+) e mutantes deficientes da atividade *uvrA* (Uvr^- ; ver Tabela 25-6). Eles primeiro mediram as taxas de mutagênese. A rifampicina é um inibidor da RNA-polimerase (ver Capítulo 26). Na sua presença, as células não crescem, a não ser que ocorram algumas mutações no gene que codifica a RNA-polimerase. O aparecimento de colônias resistentes à rifampicina fornece, assim, uma medida útil das taxas de mutagênese.

Os efeitos de concentrações diferentes de R7000 foram determinados, com os resultados mostrados no gráfico a seguir.



- (a) Por que alguns mutantes são produzidos mesmo quando não há R7000 presente?

Quillardet e colaboradores também mediram a taxa de sobrevivência de bactérias tratadas com diferentes concentrações de R7000, obtendo os resultados a seguir.



- (b) Explique como o tratamento com R7000 é letal para as células.
(c) Explique as diferenças nas curvas de mutagênese e nas curvas de sobrevivência para os dois tipos de bactérias, Uvr^+ e Uvr^- , como mostrado nos gráficos.

Os pesquisadores mediram, então, a quantidade de R7000 ligado covalentemente ao DNA nas cepas Uvr^+ e Uvr^- de *E. coli*. Eles incubaram as bactérias com [^3H] R7000 por 10 ou 70 minutos, extraíram o DNA e mediram seu conteúdo de ^3H em contagens por minuto (cpm) por mg de DNA.

Tempo (minutos)	^3H no DNA (cpm/μg)	
	Uvr^+	Uvr^-
10	76	159
70	69	228

- (d) Explique por que a quantidade de ^3H diminui com o tempo na linhagem Uvr^+ e aumenta com o tempo na linhagem Uvr^- .

Quillardet e colaboradores, então, examinaram as mudanças nas sequências de DNA específicas causadas pelo R7000 nas bactérias Uvr^+ e Uvr^- . Para tanto, eles utilizaram seis linhagens diferentes de *E. coli*, cada uma com uma mutação de ponto diferente no gene *lacZ*, o qual

codifica a β -galactosidase (essa enzima catalisa a mesma reação que a lactase; ver Figura 14-11). Células com qualquer dessas mutações têm uma β -galactosidase não funcional e são incapazes de metabolizar lactose (i.e., um fenótipo Lac^-). Cada tipo de mutação de ponto precisou de uma mutação revertida específica para restaurar a função do gene *lacZ* e o fenótipo Lac^+ . Cultivando células em um meio de cultura contendo lactose como única fonte de carbono, foi possível selecionar aquelas com mutação revertida, ou seja, células Lac^+ . Pela contagem do número de células Lac^+ após a mutagênese de uma determinada linhagem, os pesquisadores puderam medir as frequências de cada tipo de mutação.

Primeiro, eles olharam o espectro de mutação nas células Uvr^- . A tabela a seguir mostra os resultados para as seis linhagens, CC101 a CC106 (com a mutação de ponto necessária para produzir células Lac^+ indicada entre parênteses).

Número de células Lac^+ (média \pm DP)						
	CC101 (A=T para C=G)	CC102 (G=C para A=T)	CC103 (G=C para C=G)	CC104 (G=C para T=A)	CC105 (A=T para T=A)	CC106 (A=T para G=C)
R7000 ($\mu\text{g/mL}$)						
0	6 \pm 3	11 \pm 9	2 \pm 1	5 \pm 3	2 \pm 1	1 \pm 1
0,075	24 \pm 19	34 \pm 3	8 \pm 4	82 \pm 23	40 \pm 14	4 \pm 2
0,15	24 \pm 4	26 \pm 2	9 \pm 5	180 \pm 71	130 \pm 50	3 \pm 2

- (e) Que tipos de mutações mostram aumentos significativos acima da taxa basal de mutação em função do tratamento com R7000? Dê uma explicação plausível para o fato de algumas apresentarem frequência maior do que outras.

- (f) Todas as mutações que você listou em (e) poderiam ser explicadas como resultado de uma ligação covalente do R7000 a um par de bases G=C? Explique o raciocínio utilizado.
- (g) A Figura 25-27b mostra como a metilação de resíduos de guanina pode levar a mutação de G=C para A=T. Usando uma via semelhante, mostre como um aduto R7000-G pode levar a mutações G=C para A=T ou T=A mostrado acima. Qual base parecia com o aduto R7000-G?

Os resultados para a bactéria Uvr^+ são mostrados na tabela a seguir:

Número de células Lac^+ (média \pm DP)						
	CC101 (A=T para C=G)	CC102 (G=C para A=T)	CC103 (G=C para C=G)	CC104 (G=C para T=A)	CC105 (A=T para T=A)	CC106 (A=T para G=C)
R7000 ($\mu\text{g/mL}$)						
0	2 \pm 2	10 \pm 9	3 \pm 3	4 \pm 2	6 \pm 1	0,5 \pm 1
1	7 \pm 6	21 \pm 9	8 \pm 3	23 \pm 15	13 \pm 1	1 \pm 1
5	4 \pm 3	15 \pm 7	22 \pm 2	68 \pm 25	67 \pm 14	1 \pm 1

- (h) Esses resultados mostram que todos os tipos de mutações são reparados com igual fidelidade? Dê uma explicação plausível para a sua resposta.

Referência

Quillardet, P., E. Touati e M. Hofnung. 1996. Influence of the *uvr*-dependent nucleotide excision repair on DNA adducts formation and mutagenic spectrum of a potent genotoxic agent: 7-methoxy-2-nitronaphtho[2,1-b]furan (R7000). *Mutat. Res.* 358:113–122.

Metabolismo de RNA

- 26.1 Síntese de RNA dependente de DNA 1036
- 26.2 Processamento de RNA 1047
- 26.3 Síntese de RNA dependente de RNA e síntese de DNA dependente de RNA 1063

A expressão da informação de um gene geralmente envolve a produção de uma molécula de RNA transcrita a partir de um molde de DNA. À primeira vista, fitas de RNA e DNA podem ser muito semelhantes, diferindo apenas pelo fato de o RNA ter um grupo hidroxila na posição 2' da aldopentose e ter uracila, em vez de timina. No entanto, ao contrário do DNA, a maioria dos RNA desempenham suas funções como fitas simples, que se dobram sobre si mesmas e têm potencial para uma diversidade estrutural muito maior do que o DNA (Capítulo 8). O RNA é, portanto, adequado para uma variedade de funções celulares.

O RNA é a única macromolécula conhecida que tem um papel tanto no armazenamento da informação quanto na catálise, o que levou a muita especulação a respeito do seu possível papel como intermediário químico no desenvolvimento da vida na Terra. A descoberta de RNA catalisadores, ou ribozimas, alterou a própria definição de enzima, estendendo-a além do domínio das proteínas. As proteínas, no entanto, permanecem essenciais para o RNA e suas funções. Na biosfera atual, todos os ácidos nucleicos, incluindo os RNA, formam complexos com proteínas. Alguns desses complexos são bastante elaborados, e o RNA pode assumir tanto papéis estruturais quanto catalíticos no interior de máquinas bioquímicas complicadas.

Todas as moléculas de RNA, exceto os genomas de RNA de certos vírus, são derivadas de informação permanentemente armazenada no DNA. Durante a **transcrição**, um sistema de enzimas converte a informação genética de um segmento de dupla-fita de DNA em um filamento de RNA com uma sequência de bases complementar a uma das fitas de DNA. São produzidos três tipos principais de RNA. Os **RNA mensageiros (mRNA)** codificam a sequência de aminoácidos de um ou mais polipeptídeos especificados por um gene ou conjunto de genes. Os **RNA**

transportadores (tRNA) leem a informação codificada no mRNA e transferem o aminoácido adequado para uma cadeia polipeptídica em crescimento durante a síntese proteica. Os **RNA ribossômicos (rRNA)** são constituintes dos ribossomos, as máquinas celulares intrincadas que sintetizam proteínas. Muitos RNA adicionais especializados têm funções regulatórias ou catalíticas ou são precursores das três classes principais de RNA. Esses RNA de função especial não são mais considerados como espécies secundárias no catálogo de RNA celulares. Nos vertebrados, os tipos de RNA que não se encaixam em uma das categorias clássicas (mRNA, tRNA, rRNA) parecem exceder enormemente aqueles que o fazem.

Durante a replicação, geralmente o cromossomo inteiro é copiado, porém a transcrição é mais seletiva. Apenas genes ou grupos de genes particulares são transcritos em dado momento, e algumas porções do genoma de DNA nunca são transcritas. A célula restringe a expressão da informação genética à formação dos produtos gênicos necessários em qualquer momento particular. Sequências regulatórias específicas marcam o início e o fim dos segmentos de DNA a serem transcritos e marcam qual fita no duplex de DNA será usada como molde. O próprio transcrito pode interagir com outras moléculas de RNA como parte do programa regulatório geral. A regulação da transcrição é descrita em detalhes no Capítulo 28.

A soma de todas as moléculas de RNA produzidas em uma célula sob um determinado conjunto de condições é chamada de **transcriptoma** celular. Dada a fração relativamente pequena do genoma humano destinada a genes codificadores de proteínas, seria esperado que apenas uma pequena parte do genoma humano fosse transcrita, o que não é o caso. Análises modernas de padrões de transcrição revelaram que muito do genoma de seres humanos e outros mamíferos é transcrito em RNA. Os produtos não são predominantemente mRNA, tRNA ou rRNA, mas sim RNA de função especial, dos quais uma série está sendo descoberta. Muitos deles parecem estar envolvidos na regulação da expressão gênica; entretanto, o ritmo rápido de descoberta nos forçou a reconhecer que não se sabe o que muitos desses RNA fazem.

Neste capítulo, examinaremos a síntese de RNA a partir de um molde de DNA e o processamento pós-síntese e a reposição de moléculas de RNA. Ao fazê-lo, são abordadas muitas das funções especializadas do RNA, incluindo funções catalisadoras. De maneira interessante, os substratos para as enzimas de RNA são frequentemente outras moléculas de RNA. Também se descrevem sistemas em que o RNA é o molde, e o DNA, o produto, em vez do contrário. Portanto, as vias de informação são um círculo completo e revelam que a síntese de ácidos nucleicos dependente de molde apresenta regras-padrão, independentemente da natureza do molde ou do produto (RNA ou DNA). Esse exame da interconversão biológica de DNA e RNA como transportadores de informação leva a uma discussão a respeito da origem evolutiva da informação biológica.

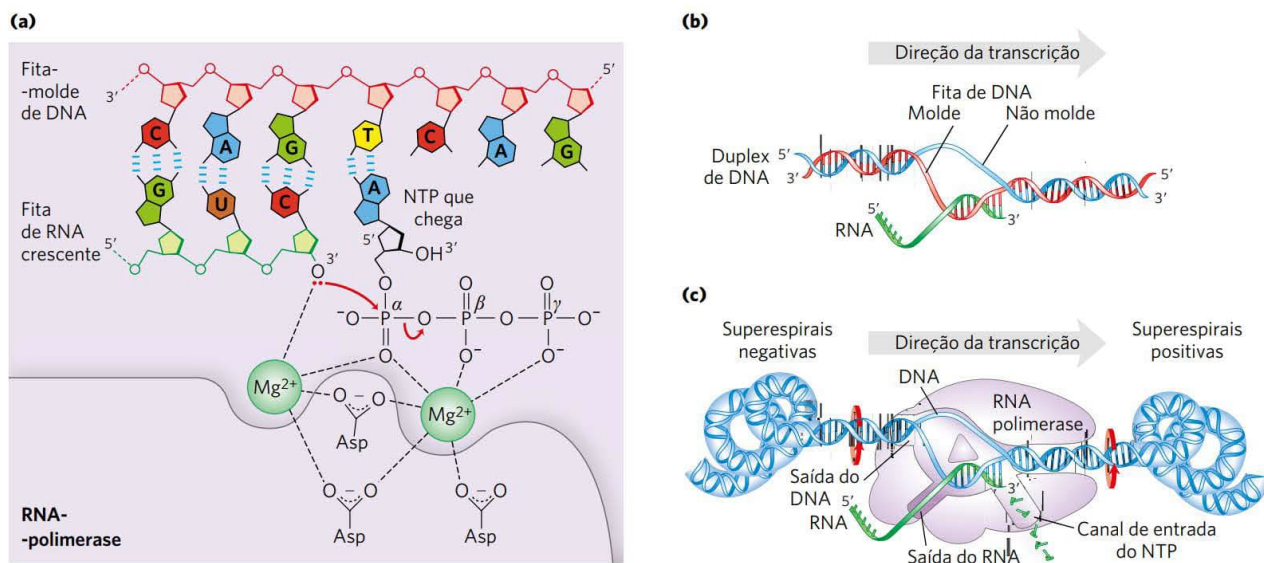
26.1 Síntese de RNA dependente de DNA

A discussão da síntese de RNA começa com uma comparação entre a transcrição e a replicação do DNA (Capítulo 25). A transcrição se parece com a replicação no seu mecanismo químico fundamental, na sua polaridade (direção da síntese) e no uso de um molde. E como a replicação, a transcrição tem fases de iniciação, alongamento e terminação. Na literatura sobre transcrição, a iniciação é subdividida em

fases discretas de ligação ao DNA e iniciação da síntese de RNA. A transcrição difere da replicação, pois ela não requer um iniciador e, geralmente, envolve apenas segmentos limitados de uma molécula de DNA. Além disso, no interior dos segmentos transcritos, apenas uma fita de DNA serve de molde para uma molécula de RNA em particular.

O RNA é sintetizado pelas RNA-polimerases

A descoberta da DNA-polimerase e sua dependência de um molde de DNA estimulou uma busca por uma enzima que sintetize RNA complementar a um filamento de DNA. Em 1960, quatro grupos de pesquisa detectaram de modo independente uma enzima em extratos celulares que podia formar um polímero de RNA a partir de ribonucleosídeos 5'-trifosfatos. Trabalhos posteriores com RNA-polimerase purificada de *Escherichia coli* ajudaram a definir as propriedades fundamentais da transcrição (**Figura 26-1**). A **RNA-polimerase dependente de DNA** precisa, além de um molde de DNA, de todos os quatro ribonucleosídeos 5'-trifosfatos (ATP, GTP, UTP e CTP) como precursores das unidades de nucleotídeos de RNA, bem como de Mg^{2+} . A proteína também liga um Zn^{2+} . A química e o mecanismo de síntese de RNA se assemelham fortemente àqueles usados pelas DNA-polimerases (ver Figura 25-5a). A RNA-polimerase alonga uma fita de RNA ao adicionar unidades



MECANISMO—FIGURA 26-1 Transcrição pela RNA-polimerase em *E. coli*. Para a síntese de uma fita de RNA complementar a uma das duas fitas de DNA em uma dupla-hélice, o DNA é transitoriamente desenrolado. (a) Mecanismo catalítico da síntese de RNA pela RNA-polimerase. Observe que este é essencialmente o mesmo mecanismo usado pelas DNA-polimerases (ver Figura 25-5a). A reação envolve dois íons Mg^{2+} , coordenados para os grupos fosfato dos nucleosídeos trifosfatos (NTP) que chegam e para três resíduos Asp, que são altamente conservados nas RNA-polimerases de todas as espécies. Um íon Mg^{2+} facilita o ataque pelo grupo hidroxila 3' no fosfato α do NTP; o outro íon Mg^{2+} facilita o deslocamento do pirofosfato. Ambos os íons metálicos estabilizam o estado de transição pentacovalente.

(b) Cerca de 17 pb de DNA são desenrolados a cada momento. A RNA-polimerase e a bolha de transcrição se movem da esquerda para a direita ao longo do DNA, como mostrado, facilitando a síntese de RNA. O DNA é desenrolado à frente e enrolado novamente à medida que o RNA é transcrito. À medida que o DNA é enrolado novamente, o híbrido RNA-DNA é deslocado, e a fita de RNA é expulsa.

(c) O movimento de uma RNA-polimerase ao longo do DNA tende a criar superespirais positivas (DNA superespiralizado) à frente da bolha de transcrição e superespirais negativas (DNA superdesespiralizado) antes dela. A RNA-polimerase está em contato estreito com o DNA à frente da bolha de transcrição, bem como com as fitas separadas de DNA e RNA no interior e imediatamente antes da bolha. Um canal nas proteínas canaliza novos NTP para o sítio ativo da polimerase. O *footprint* da polimerase envolve cerca de 35 pb de DNA durante o alongamento.

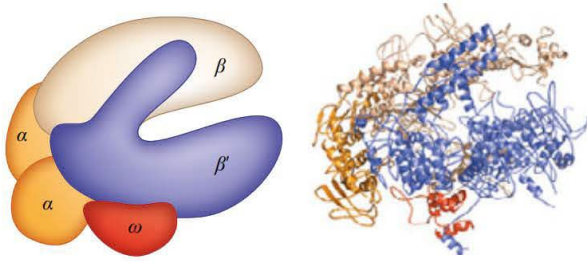


FIGURA 26-4 Estrutura da holoenzima da RNA-polimerase da bactéria *Thermus aquaticus*. A estrutura global desta enzima é muito semelhante àquela da RNA-polimerase de *E. coli*; nenhum DNA ou RNA está mostrado aqui. As várias subunidades da RNA-polimerase bacteriana dão à enzima a forma de uma garra de caranguejo. As pinças são formadas pelas grandes subunidades β e β' . As subunidades são mostradas com as mesmas cores na estrutura esquemática e em fita. [Fonte: estrutura da fita: informação de G. Zhang et al., *Cell* 98:811, 1999, baseado em PDB ID 1HQM, L. Minakhin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:892, 2001.]

(massa molecular). A subunidade σ se liga transitoriamente ao centro e direciona a enzima para sítios de ligação específicos no DNA (descritos a seguir). Essas seis subunidades constituem a holoenzima da RNA-polimerase (**Figura 26-4**). A holoenzima da RNA-polimerase da *E. coli* existe, portanto, em várias formas, dependendo do tipo da subunidade σ . A subunidade mais comum é a σ^{70} (M_r 70.000), e a discussão a seguir tem como foco a holoenzima da RNA-polimerase correspondente.

As RNA-polimerases não apresentam um sítio ativo como as exonucleases de revisão 3'→5' (como aquele de várias DNA-polimerases), e a taxa de erro na transcrição é mais alta do que aquela na replicação do DNA cromossômico – aproximadamente um erro a cada 10^4 a 10^5 ribonucleotídeos incorporados ao RNA. Como muitas cópias de um RNA são geralmente produzidas a partir de um único gene e todos os RNAs são, por fim, degradados e substituídos, um erro em uma molécula de RNA tem consequência menor para a célula do que um erro na informação permanente armazenada no DNA. Muitas RNA-polimerases, incluindo a RNA-polimerase bacteriana e a RNA-polimerase II de eucariotos (discutida a seguir), pausam realmente quando uma base malpareada é adicionada durante a transcrição, e elas podem remover os nucleotídeos errados da extremidade 3' de um transcrito por reversão direta da reação da polimerase. No entanto, não se sabe ainda se essa atividade é uma verdadeira função de revisão e em que grau ela pode contribuir para a fidelidade da transcrição.

A síntese de RNA começa nos promotores

A iniciação da síntese de RNA em pontos aleatórios da molécula de DNA seria um processo de desperdício extraordinário. Em vez disso, uma RNA-polimerase se liga a sequências específicas no DNA, chamadas de **promotores**, que governam transcrição de segmentos adjacentes de DNA (genes). As sequências em que as RNA-polimerases se ligam são variáveis, e muitas pesquisas têm se concentrado em identificar as sequências específicas que são cruciais para a função do promotor.

Em *E. coli*, a ligação da RNA-polimerase ocorre no interior de uma região que se estende desde cerca de 70 pb antes do sítio de início da transcrição até cerca de 30 pb além dele. Por convenção, os pares de bases de DNA que correspondem ao início de uma molécula de RNA recebem números positivos, e aqueles que precedem o sítio do início do RNA recebem números negativos. A região promotora se estende, portanto, entre as posições -70 e +30. Análises e comparações da classe mais comum de promotores bacterianos (aqueles reconhecidos por uma holoenzima de RNA-polimerase contendo σ^{70}) revelaram semelhanças em duas sequências curtas centradas em torno das posições -10 e -35 (**Figura 26-5**). As sequências são sítios de interação importantes para a subunidade σ^{70} . Embora as sequências não sejam idênticas em todos os promotores bacterianos nessa classe, certos nucleotídeos particularmente comuns em cada posição formam uma **sequência-consenso** (lembre-se da sequência-consenso *oriC* de *E. coli*; ver Figura 25-10). A sequência-consenso na região -10 é (5')TA-TAAT(3') e na região -35 é (5')TTGACA(3'). Um terceiro elemento de reconhecimento rico em AT, chamado de elemento UP (do inglês, *upstream promoter* [promotor a montante]), ocorre entre as posições -40 e -60 nos promotores de certos genes altamente expressos. O elemento UP está ligado pela subunidade α da RNA-polimerase. A eficiência com que uma RNA-polimerase contendo σ^{70} se liga a um promotor e inicia a transcrição é determinada, em grande parte, por essas sequências, pelo espaçamento entre elas, e pela distância do sítio de início de transcrição.

Muitas linhas de evidências independentes atestam a importância funcional das sequências nas regiões -35 e -10. Mutações que afetam a função de um determinado promotor frequentemente envolvem um par de bases nessas regiões. Variações na sequência-consenso também afetam a eficiência da ligação da RNA-polimerase e a iniciação da transcrição. Uma alteração em apenas um par de bases pode diminuir a taxa de ligação em várias ordens de magnitude. A sequência do promotor, portanto, estabelece um nível basal de expressão que pode variar enormemente de um gene de *E. coli* para o seguinte. Um método que fornece informação acerca da interação entre a RNA-polimerase e os promotores é ilustrado no Quadro 26-1.

A via de iniciação da transcrição e o destino da subunidade σ estão mostrados na **Figura 26-6**. A via consiste em duas partes principais, ligação e iniciação, cada qual com várias etapas. Primeiro, a polimerase, dirigida por seu fator ligado σ , liga-se ao promotor. Um complexo fechado (em que o DNA ligado está intacto) e um complexo aberto (em que o DNA ligado está intacto e parcialmente desenrolado próximo da sequência -10) se formam sucessivamente. Segundo, a transcrição é iniciada no interior do complexo, levando a uma mudança conformacional que converte o complexo na forma de alongamento, seguida pelo movimento do complexo de transcrição para longe do promotor (distanciamento do promotor). Qualquer uma dessas etapas pode ser afetada pela composição específica das sequências promotoras. A subunidade σ se dissocia estocasticamente (de modo aleatório) à medida que a polimerase entra na fase de alongamento da transcrição. A proteína

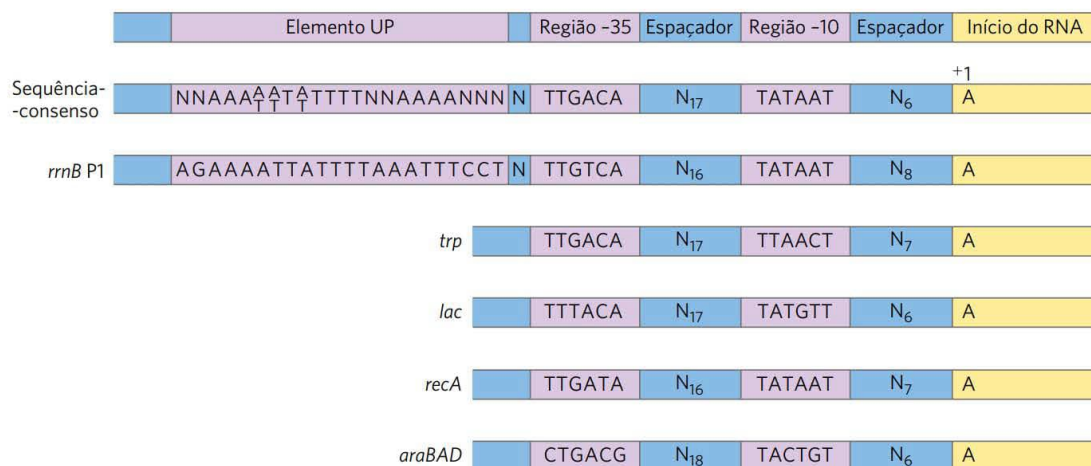


FIGURA 26-5 Promotores típicos de *E. coli* reconhecidos por uma holoenzima da RNA-polimerase contendo σ^{70} . As sequências da fita não molde são mostradas, lidas na direção 5'→3', como é a convenção para representações desse tipo. As sequências diferem de um promotor para o seguinte, mas comparações de vários promotores revelam semelhanças, particularmente nas regiões -10 e -35. O elemento de sequência UP, não encontrado em todos os promotores de *E. coli*, é mostrado no promotor P1 para o gene de rRNA altamente expresso *rrnB*. Elementos UP, que geralmente ocorrem na região entre -40 e -60, estimulam fortemente a transcrição nos promotores que os contêm. O elemento UP no promotor P1 do *rrnB* abrange a região entre -38 e -59. A sequência-consenso para os promotores da *E. coli* reconhecidos pela σ^{70} é a segunda a partir do topo. Regiões espaçadoras contêm números ligeiramente variáveis de nucleotídeos (N). É mostrado apenas o primeiro nucleotídeo codificando o transcrito de RNA (na posição +1).

NusA (M_r 54.430) se liga à RNA-polimerase em alongamento, competitivamente com a subunidade σ . Uma vez que a transcrição esteja completa, a NusA se dissocia da enzima, a RNA se dissocia do DNA e um fator σ (σ^{70} ou outro) pode novamente se ligar à enzima para iniciar a transcrição.

Como descrito mais adiante, no Capítulo 27, a transcrição de mRNA e sua tradução estão fortemente acopladas nas bactérias. Quando um gene codificador de proteína está sendo transcrito, os ribossomos se ligam rapidamente e começam a traduzir o mRNA antes que sua síntese esteja completa. Outra proteína, NusG, liga-se diretamente ao ribossomo e à RNA-polimerase, ligando os dois complexos. A velocidade de tradução afeta diretamente a velocidade de transcrição.

E. coli tem outras classes de promotores, ligados pelas holoenzimas da RNA-polimerase com subunidades σ diferentes (Tabela 26-1). Um exemplo são os promotores dos genes de choque térmico. Os produtos desse conjunto de genes são produzidos em níveis superiores quando a célula recebe uma ameaça, como um aumento repentino de temperatura. A RNA-polimerase se liga aos promotores desses genes apenas quando σ^{70} é substituído pela subunidade σ^{32} (M_r 32.000), específica para os promotores de choque térmico (ver Figura 28-3). Ao empregar diferentes subunidades σ , a célula pode coordenar a expressão de conjuntos de genes, permitindo alterações importantes na fisiologia celular. A escolha de quais conjuntos de genes serão expressos depende da disponibilidade das várias subunidades σ , o que, por sua vez, é determinado por vários fatores: taxas reguladas de síntese e degradação, modificações pós-síntese que alternam entre as formas ativa e inativa das subunidades individuais σ e uma classe especializada de proteínas anti- σ , cada tipo ligando-se e sequestrando uma subunidade σ específica (tornando-a indisponível para a iniciação da transcrição).

A transcrição é regulada em vários níveis

As necessidades de qualquer produto gênico variam com as condições celulares ou o estágio de desenvolvimento, e a transcrição de cada gene é regulada cuidadosamente para formar produtos gênicos apenas nas proporções necessárias. A regulação pode ocorrer em qualquer etapa na transcrição, incluindo o alongamento e a terminação. Entretanto, boa parte da regulação é direcionada para a ligação da polimerase e etapas de iniciação da transcrição destacadas na Figura 26-6. Diferenças nas sequências de promotores são apenas um dos vários níveis de controle.

A ligação de proteínas a sequências tanto próximas quanto distantes do promotor também pode afetar os níveis de expressão gênica. A ligação de proteínas pode *ativar* a transcrição ao facilitar tanto a ligação da RNA-polimerase como das etapas mais adiante no processo de iniciação, ou ela pode *reprimir* a transcrição ao bloquear a atividade da polimerase. Em *E. coli*, uma proteína que ativa a transcrição é a **proteína receptora de cAMP** (CRP), que aumenta a transcrição de genes que codificam enzimas que metabolizam outros açúcares além da glicose quando as células crescem na ausência da mesma. **Repressores** são proteínas que bloqueiam a síntese do RNA em genes específicos. No caso do repressor Lac (Capítulo 28), a transcrição dos genes para as enzimas do metabolismo da lactose é bloqueada quando há disponibilidade de lactose.

A transcrição é a primeira etapa na complicada e energeticamente intensa via da síntese proteica, de modo que a maior parte da regulação dos níveis de proteína, tanto nas células bacterianas quanto eucarióticas, ocorre na transcrição, particularmente em seus estágios iniciais. O Capítulo 28 descreve vários mecanismos pelos quais a regulação é feita.

QUADRO 26-1 MÉTODOS A RNA-polimerase deixa sua digital em um promotor

Footprinting, uma técnica derivada dos princípios usados no sequenciamento de DNA, identifica as sequências de DNA ligadas por uma proteína em particular. Os pesquisadores isolam um fragmento de DNA que supõem conter sequências reconhecidas por uma proteína ligadora de DNA e marcam radioativamente a extremidade de uma das fitas (Figura Q-1). Eles empregam, então, reagentes químicos ou enzimáticos para introduzir quebras aleatórias no fragmento de DNA (cerca de uma por

molécula). A separação dos produtos clivados marcados (fragmentos quebrados de vários comprimentos) por eletroforese de alta resolução produz uma escala de bandas radioativas. Em um tubo separado, o procedimento de clivagem é repetido em cópias do mesmo fragmento de DNA na presença da proteína ligadora de DNA. Os pesquisadores, então, submetem os dois conjuntos de produtos de clivagem à eletroforese e os comparam lado a lado. Um intervalo ("footprint") na série de bandas radioativas, derivado da amostra de DNA-proteína, atribuível à proteção do DNA pela proteína ligadora, identifica as sequências que a proteína liga.

A localização precisa do sítio da proteína ligadora pode ser determinada por sequenciamento direto (ver Figura 8-35) de cópias do mesmo fragmento de DNA e incluir as raías de sequenciamento (não mostradas aqui) no mesmo gel com o *footprint*. A Figura Q-2 mostra os resultados do *footprinting* para a ligação da RNA-polimerase a um fragmento de DNA contendo um promotor. A polimerase abrange 60 a 80 pb; a proteção pela enzima ligada inclui as regiões -10 e -35.

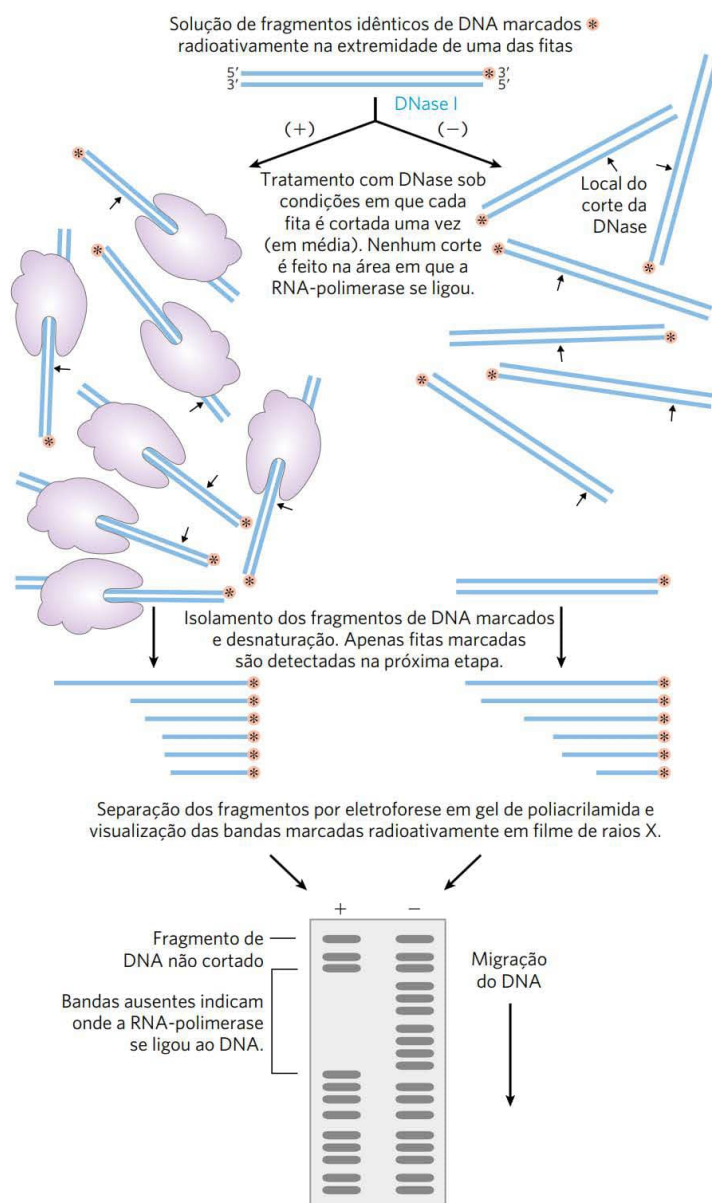


FIGURA Q-1 Análise de *footprint* do sítio de ligação da RNA-polimerase em um fragmento de DNA. Experimentos separados são realizados na presença (+) e na ausência (-) da polimerase.

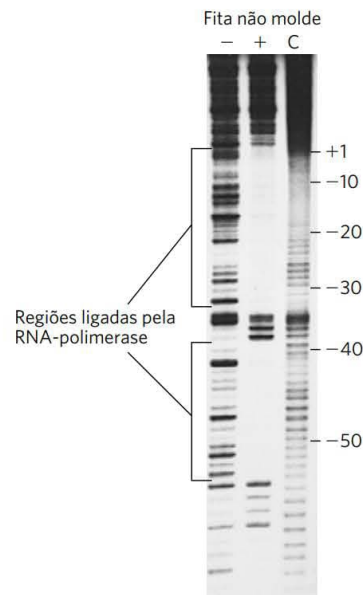


FIGURA Q-2 Resultados do *footprinting* da RNA-polimerase se ligando ao promotor *lac* (ver Figura 26-5). Nesse experimento, a extremidade 5' da fita não molde foi marcada radioativamente. A coluna C é um controle em que os fragmentos de DNA marcados foram clivados com um reagente químico que produz um padrão de bandamento mais uniforme. [Fonte: © cortesia do Carol Gross Laboratory.]

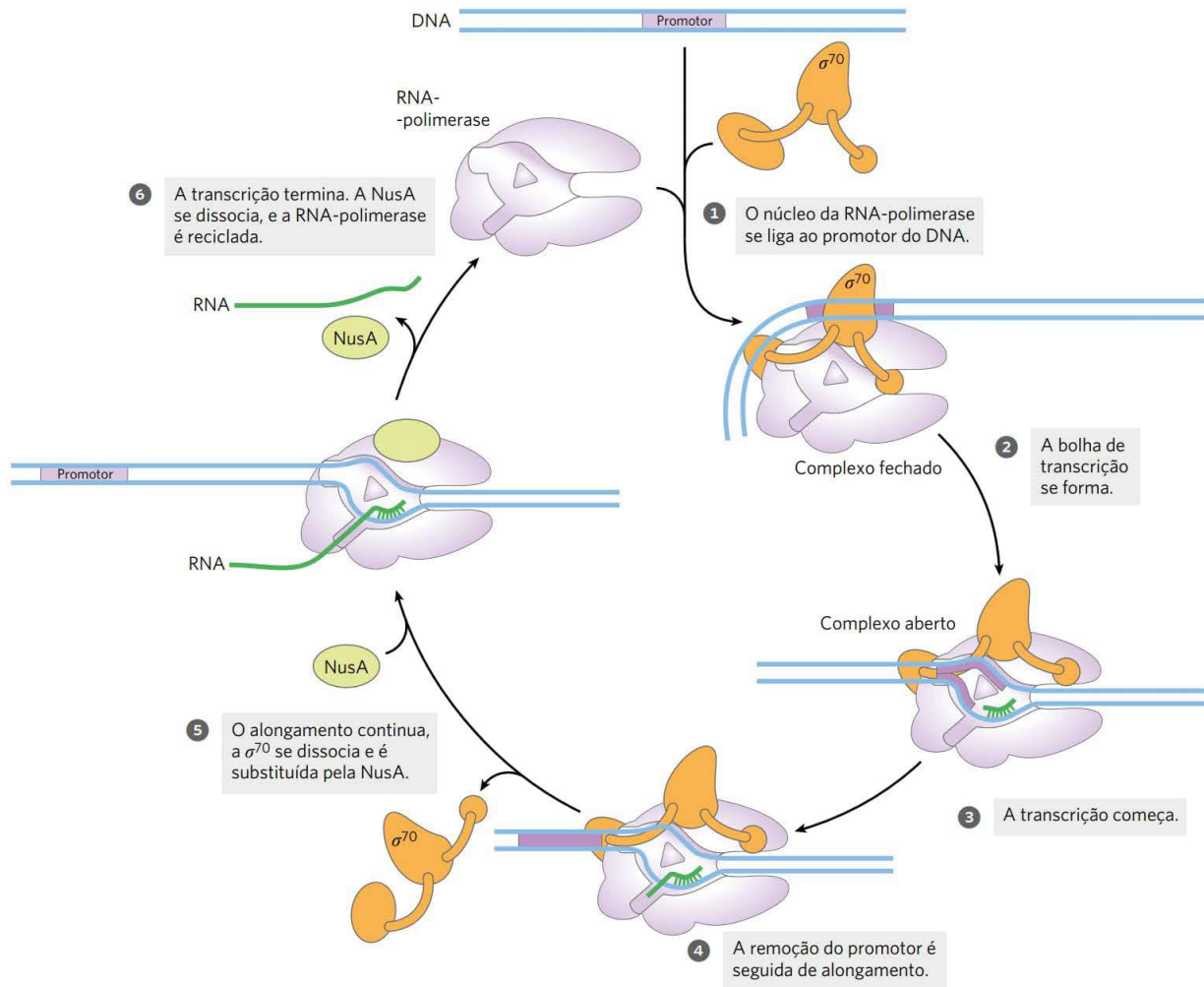


FIGURA 26-6 Início da transcrição e alongamento pela RNA-polimerase da *E. coli*. O início da transcrição precisa de várias etapas geralmente divididas em duas fases, ligação e início. Na fase de ligação, a interação inicial da RNA-polimerase com o promotor leva à formação de um complexo fechado, no qual o DNA promotor é ligado de maneira estável, mas não desenrolado. Uma região de 12 a 15 pb de DNA – do interior da região –10 à posição +12 ou +3 – é, então, desenrolado para formar um complexo aberto. Intermediários adicionais (não mostrados) foram detectados nas vias que levam aos complexos fechados e abertos, junto com várias mudanças na conformação proteica. A fase de iniciação envolve o início da transcrição e a remoção do promotor (etapas 1 a 4 aqui). Uma vez que o alongamento começa, a subunidade σ é liberada e substituída pela proteína NusA. A polimerase deixa o promotor e fica comprometida com o alongamento do RNA (etapa 5). Quando a transcrição está completa, o RNA é liberado, a proteína NusA se dissocia e a RNA-polimerase se dissocia do DNA (etapa 6). Outra subunidade σ se liga à RNA-polimerase e o processo se reinicia.

Sequências específicas sinalizam a terminação da síntese de RNA

A síntese de RNA é progressiva; isto é, a RNA-polimerase introduzirá um grande número de nucleotídeos em uma molécula de RNA crescente antes de se dissociar (p. 993). Isso é necessário, pois, se a polimerase liberasse um transcrito de RNA prematuramente, não poderia retomar a síntese do mesmo RNA e teria que recomeçar. Entretanto, um encontro com certas sequências de DNA resulta em uma pausa na síntese de RNA, e, em algumas dessas sequências, a transcrição é terminada. O foco aqui é, mais uma vez, nos sistemas bem estudados de bactérias. *E. coli* tem pelo menos duas classes de sinais de terminação: uma classe se baseia em um fator proteico chamado ρ (rho) e a outra é independente de ρ .

A maioria dos terminadores independentes de ρ tem duas características distintas. A primeira é uma região que produz um transcrito de RNA com sequências autocomplementares, permitindo a formação de uma estrutura em grampo (ver Figura 8-19a) com 15 a 20 nucleotídeos no centro antes da extremidade projetada da fita de RNA. A segunda característica é um filamento altamente conservado de três resíduos A na fita-molde que são transcritos em resíduos U próximo da extremidade 3' do grampo. Quando uma polimerase chega a um sítio de terminação com essa estrutura, ela pausa (Figura 26-7a). A formação da estrutura em grampo no RNA interrompe vários pares de bases A=U no segmento híbrido de RNA-DNA e pode interromper interações importantes entre o RNA e a RNA-polimerase, facilitando a dissociação do transcrito.

TABELA 26-1 As sete subunidades σ da *E. coli*

Subunidade σ	Kd (nm)	Moléculas/célula ^a	Fração da holoenzima (%) ^a	Função
$\sigma 70$	0,26	700	78	Manutenção
$\sigma 54$	0,30	110	8	Modulação dos níveis de nitrogênio celular
$\sigma 38$	4,26	1	0	Genes da fase estacionária
$\sigma 32$	1,24	< 10	0	Genes de choque térmico
$\sigma 28$	0,74	370	14	Flagelos e genes de quimiotaxia
$\sigma 24$	2,43	< 10	0	Funções extracitoplasmáticas, algumas funções de choque térmico
$\sigma 18$	1,73	< 1	0	Funções extracitoplasmáticas, incluindo o transporte de citrato férrico

Fonte: dados de H. Maeda et al., *Nucleic Acids Res.* 28:3497, 2000.

Nota: os fatores σ estão amplamente distribuídos em bactérias; o número varia de um único fator σ em *Mycoplasma genitalium* a 63 fatores σ distintos em *Streptomyces coelicolor*.

^aNúmero aproximado de cada subunidade σ por célula e a fração da holoenzima de RNA-polimerase complexada com cada subunidade σ durante o crescimento exponencial. As quantidades mudam à medida que as condições de crescimento se alteram. A fração da RNA-polimerase complexada com cada subunidade σ reflete tanto a quantidade de uma subunidade específica quanto a sua afinidade pela enzima.

Os terminadores dependentes de ρ não têm a sequência de resíduos repetidos de A na fita-molde, mas, em geral, incluem uma sequência rica em CA, chamada de elemento *rut* (do inglês, *rho utilization* [emprego de rho]). A proteína se associa ao RNA em locais de ligação específicos e migra na direção 5'→3' até alcançar o complexo de transcrição que é pausado em um local de terminação (Figura 26-7b). Aqui, ela contribui para liberar o transcrito de RNA. A proteína ρ tem uma atividade de helicase de RNA-DNA dependente de ATP que promove a translocação da proteína ao longo do RNA, sendo o ATP hidrolisado pela proteína ρ durante o processo de terminação. O mecanismo detalhado pelo qual a proteína promove a liberação do transcrito de RNA não é conhecido.

As células eucarióticas têm três tipos de RNA-polimerases nucleares

O maquinário da transcrição no núcleo de uma célula eucariótica é muito mais complexo do que em bactérias. Os eucariotos têm três RNA-polimerases, designadas I, II e III, que são complexos distintos, mas que apresentam certas subunidades em comum. Cada polimerase tem uma função específica e é recrutada para uma sequência promotora específica.

A RNA-polimerase I (Pol I) é responsável pela síntese de apenas um tipo de RNA, um transcrito chamado de RNA pré-ribossômico (ou pré-rRNA), que contém o precursor dos rRNA 18S, 5,8S e 28S (ver Figura 26-24). Os promotores da Pol I diferem significativamente de uma espécie para outra. A principal função da RNA-polimerase II (Pol II) é a síntese de mRNA e de alguns RNA especializados. Essa enzima pode reconhecer milhares de promotores que variam drasticamente em suas sequências. Alguns promotores da Pol II apresentam algumas sequências em comum, incluindo um TATA *box* (sequência-consenso de eucariotos TATA(A/T)A(A/T)(A/G)) próxima do par de bases -30 e uma sequência Inr (iniciador) próxima do sítio de início do RNA em +1 (Figura 26-8). No entanto, esses promotores

são a minoria, e interações elaboradas com proteínas reguladoras guiam a função Pol II em muitos promotores que não possuem essas características.

A RNA-polimerase III (Pol III) produz tRNA, o rRNA 5S e alguns outros RNA pequenos especializados. Os promotores reconhecidos pela Pol III estão bem caracterizados. De modo interessante, algumas das sequências necessárias para o início regulado da transcrição pela Pol III estão localizadas no interior do próprio gene, ao passo que outras estão em localizações mais convencionais a montante do sítio de iniciação do RNA (Capítulo 28).

A RNA-polimerase II precisa de muitos outros fatores proteicos para a sua atividade

A RNA-polimerase II é central para a expressão gênica de eucariotos e tem sido extensamente estudada. Embora essa polimerase seja surpreendentemente mais complexa do que a sua contraparte bacteriana, a complexidade mascara uma impressionante conservação na estrutura, na função e no mecanismo. A Pol II isolada a partir de células de levedura ou de células humanas é uma enzima de 12 subunidades com uma massa molecular agregada de mais de 510 mil. A maior subunidade (RBP1) apresenta um alto grau de homologia com a subunidade β' da RNA-polimerase bacteriana. Outra subunidade (RBP2) é estruturalmente semelhante à subunidade β bacteriana, e duas outras (RBP3 e RBP11) mostram alguma homologia estrutural com duas subunidades α bacterianas. A Pol II deve funcionar com genomas mais complexos e com moléculas de DNA mais elaboradamente acondicionadas do que nas bactérias. A necessidade de contatos proteína-proteína com os outros numerosos fatores proteicos necessários para navegar por esse labirinto é responsável em grande medida pela complexidade adicional da polimerase de eucariotos.

A subunidade maior de Pol II (RBP1) também tem uma característica incomum, uma longa cauda carboxiterminal, consistindo em várias repetições de uma sequência-consenso de sete aminoácidos -YSPTSPS-. Há 27 repetições

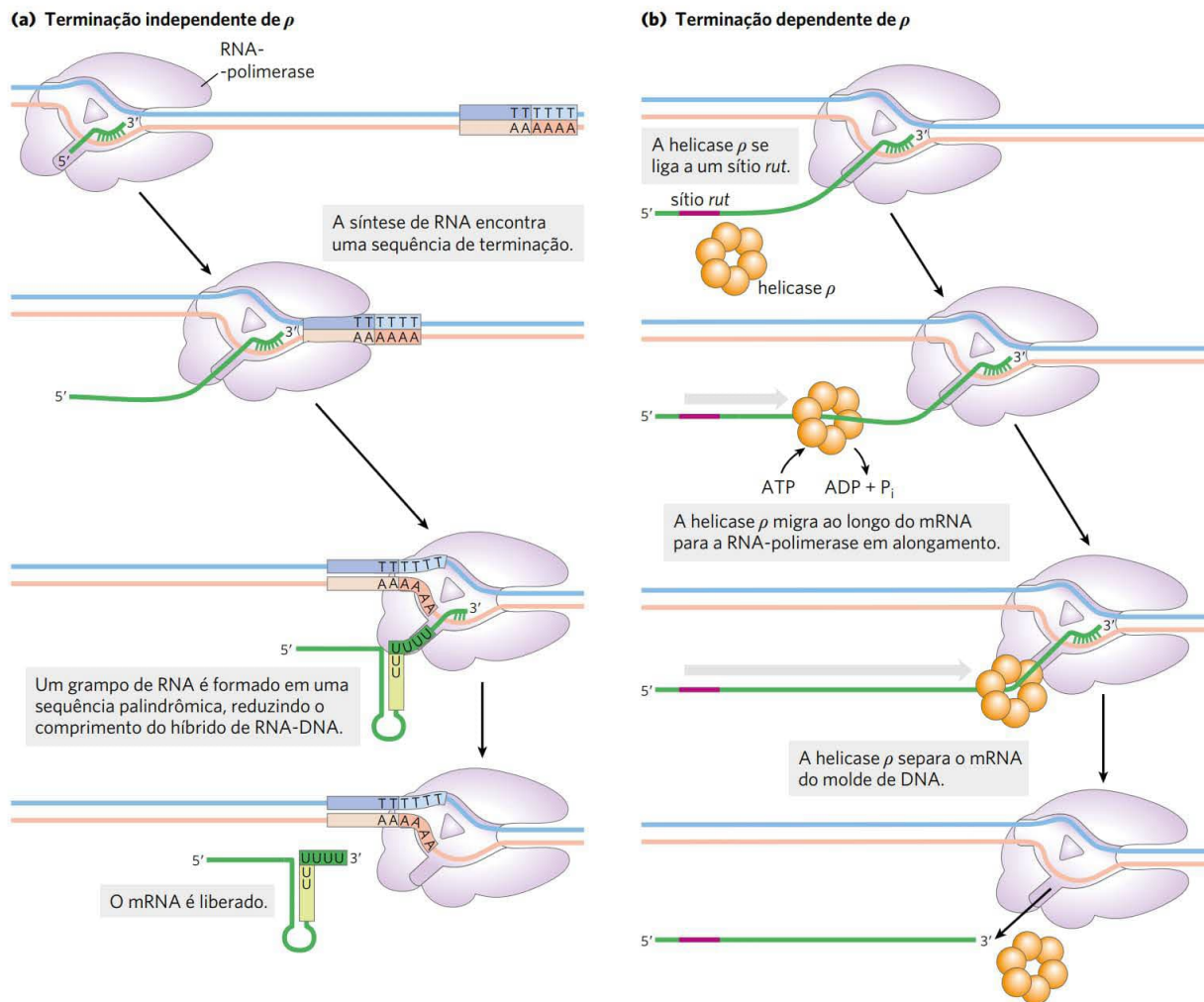


FIGURA 26-7 Terminação da transcrição em *E. coli*. (a) Terminação independente de ρ . A RNA-polimerase pausa a transcrição em várias sequências de DNA, algumas das quais são terminadoras. Um de dois resultados é, então, possível: a polimerase evita o sítio e continua no seu caminho, ou o complexo sofre uma mudança conformacional (isomerização). Nesse último caso, o pareamento intramolecular de sequências complementares no transcrito de RNA recém-formado pode formar um grampo que rompe o híbrido RNA-DNA ou as interações entre o RNA e a polimerase, ou ambos, resultando em isomerização. Uma região híbrida A=U na extremidade 3' do novo transcrito é relativamente instável, e o RNA se dissocia do complexo completamente, levando à terminação. Esse é o resultado comum nos terminadores. Em outros sítios de pausa, o complexo pode escapar após a etapa de isomerização para continuar a síntese de RNA. (b) Terminação dependente de ρ . Os RNAs que incluem um sítio rut (roxo) recrutam a helicase ρ . A helicase ρ migra ao longo do mRNA na direção 5'→3' e se separa da polimerase.

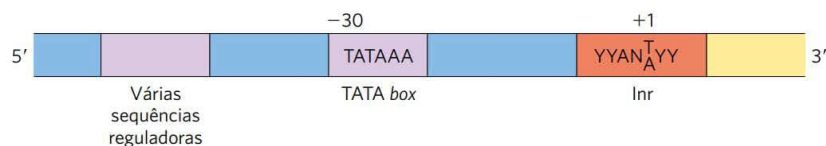


FIGURA 26-8 Algumas sequências comuns em promotores reconhecidos pela RNA-polimerase II. O TATA box é o principal ponto de reunião para as proteínas dos complexos de pré-iniciação de Pol II. O DNA é desenrolado na sequência iniciadora (Inr), e o sítio de início de transcrição está geralmente no interior dessa sequência ou muito próximo dela. Na sequência-consenso Inr mostrada aqui, N representa qualquer nucleotídeo; Y, nucleotídeo de pirimidina. Muitas sequências adicionais servem como sítios de ligação para uma grande variedade de proteínas que afetam a atividade da Pol II. Essas sequências são importantes na regulação dos promotores Pol II e diferem significativamente em tipo e número e, em geral, o promotor de eucariotos é muito mais complexo do que sugerido aqui (ver Figura 15-25). Muitas das sequências estão localizadas no interior de algumas poucas centenas de pares de bases do TATA box no lado 5'; outras podem estar a milhares de pares de bases de distância. Os elementos de sequência resumidos aqui são mais variáveis entre os promotores da Pol II de eucariotos do que entre os promotores de *E. coli* (ver Figura 26-5). A maioria dos promotores da Pol II não tem TATA box, elemento-consenso Inr, ou ambos. Sequências adicionais em torno do TATA box e abaixo (para a direita, como desenhado) do Inr podem ser reconhecidas por um ou mais fatores de transcrição.

TABELA 26-2 Proteínas necessárias para a iniciação da transcrição nos promotores da RNA-polimerase II (Pol II) de eucariotos

Proteína de transcrição	Número de subunidades diferentes	Subunidade(s) <i>M_r</i>	Função(ões)
Iniciação			
Pol II	12	7.000-220.000	Catalisa a síntese de RNA
TBP (proteína ligadora do TATA)	1	38.000	Reconhece especificamente o TATA <i>box</i>
TFIIA	2	13.000, 42.000.	Estabiliza a ligação do TFIIB e TBP ao promotor
TFIIB	1	35.000	Liga-se ao TBP; recruta o complexo Pol II-TFIIF
TFIIDb	13-14	14.000-213.000	Necessário para iniciação em promotores sem TATA <i>box</i>
TFIIE	2	33.000, 50.000.	Recruta o TFIIH; tem atividades de ATPase e helicase
TFIIF	2-3	29.000-58.000	Se liga fortemente à Pol II; se liga à TFIIB e impede a ligação da Pol II às sequências de DNA não específicas
TFIIH	10	35.000-89.000	Desenrola o DNA no promotor (atividade de helicase); fosforila a Pol II (no interior do CTD); recruta proteínas de reparo de excisão de nucleotídeos
Alongamento^c			
ELLd	1	80.000	
pTEFb	2	43.000, 124.000.	Fosforila a Pol II (no interior do CTD)
SII (TFIIS)	1	38.000	
Elonguina (SIH)	3	15.000, 18.000, 110.000	

^a*M_r* reflete as subunidades presentes nos complexos de células humanas. Alguns componentes diferem um pouco em tamanho em leveduras.

^bA presença de várias cópias de algumas subunidades de TFIID eleva a composição total da subunidade do complexo para 21 a 22.

^cA função de todos os fatores de alongamento é a de suprimir a pausa ou a interrupção da transcrição pelo complexo Pol II-TFIIF.

^dNome derivado de leucemia rica em lisina 11-19 (do inglês, *eleven-nineteen lysine-rich leukemia*). O gene para ELL é o local dos eventos de recombinação cromossômica frequentemente associado à leucemia mieloide aguda.

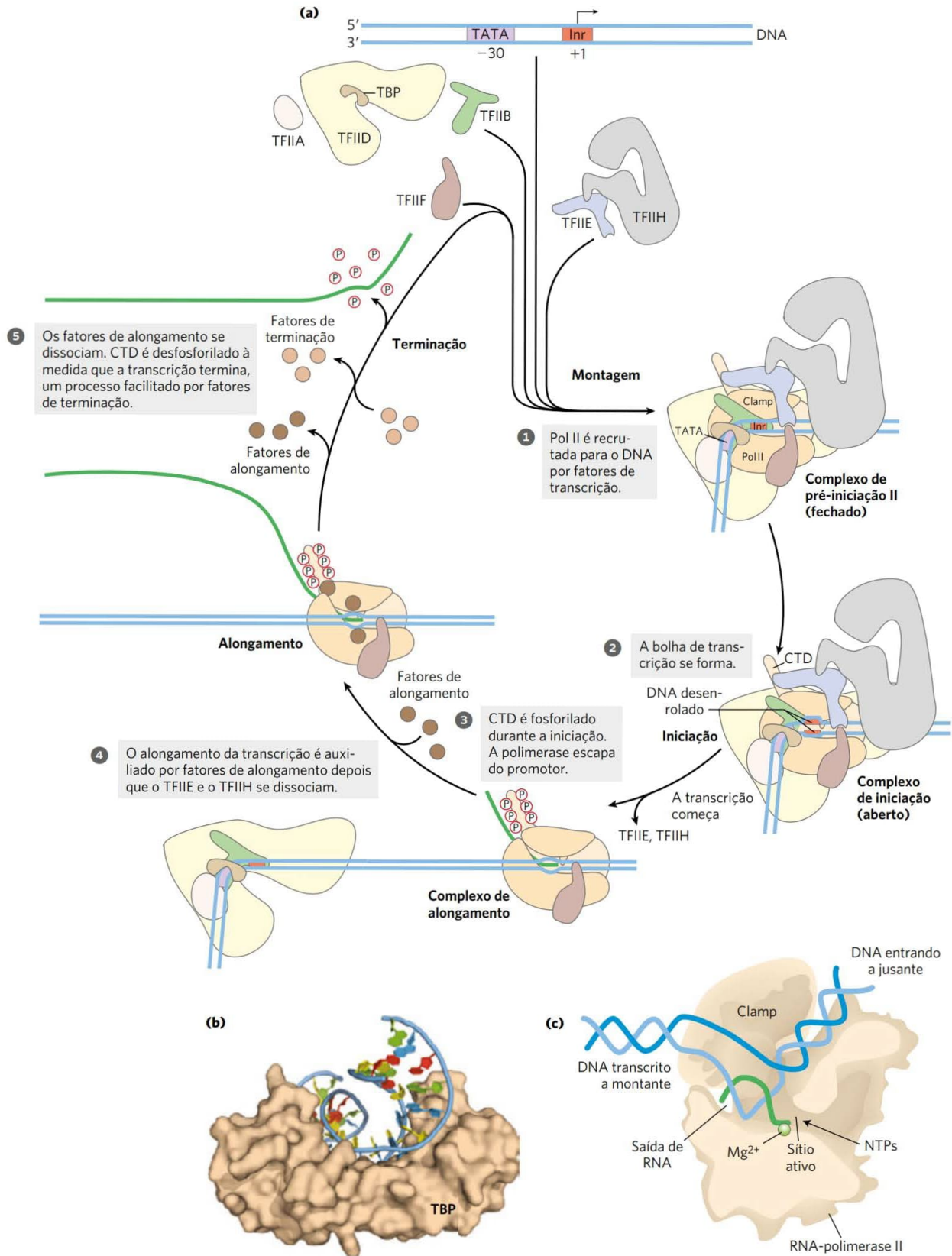
na enzima de levedura (18 exatamente correspondentes ao consenso) e 52 (21 exatos) nas enzimas de camundongos e de seres humanos. Esse domínio carboxiterminal (CTD) é separado do corpo principal da enzima por uma sequência ligadora inerentemente não estruturada. A CTD tem vários papéis importantes na função da Pol II, como destacado a seguir.

A RNA-polimerase II requer uma série de outras proteínas, chamadas de **fatores de transcrição**, a fim de formar o complexo de transcrição ativo. Os **fatores de transcrição gerais** necessários a cada promotor da Pol II (fatores geralmente designados TFII com um identificador adicional) são altamente conservados em todos os eucariotos (Tabela 26-2). O processo de transcrição pela Pol II pode ser descrito em termos de várias fases – montagem, iniciação, alongamento, terminação –, cada uma associada a proteínas características (**Figura 26-9**). A via descrita passo a passo a seguir leva à transcrição ativa *in vitro*. Na célula, várias das proteínas podem estar presentes em complexos maiores pré-montados, simplificando as vias

para a montagem de promotores. À medida que lê sobre esse processo, consulte a Figura 26-9 e a Tabela 26-2 para ajudar a acompanhar os muitos participantes.

FIGURA 26-9 Transcrição nos promotores da RNA-polimerase II.

(a) O TBP (frequentemente com TFIIA e, por vezes, com TFIID) e o TFIIB se ligam sequencialmente a um promotor. TFIIF mais Pol II são, então, recrutados para esse complexo. A adição de TFIIE e TFIIH resulta em um complexo fechado. Dentro do complexo, o DNA é desenrolado na região de *Inr* pela atividade de helicase de TFIIH e, talvez, de TFIIE, criando um complexo aberto que completa a montagem. O domínio carboxiterminal da maior subunidade de Pol II é fosforilado por TFIIH, e a polimerase, então, escapa do promotor e começa a transcrição. O alongamento é acompanhado pela liberação de vários fatores de transcrição e estimulado por fatores de alongamento (ver Tabela 26-2). Após a terminação, a Pol II é liberada, desfosforilada e reciclada. (b) TBP humana ligada ao DNA. O DNA é dobrado neste complexo, abrindo o sulco menor para permitir a ligação específica de hidrogênio entre a proteína e o DNA. (c) Uma visão em corte do alongamento da transcrição promovido pela enzima do núcleo da Pol II. [Fonte: (b) PDB ID 1TGH, Z. S. Juo et al., *J. Mol. Biol.* 261:239, 1996.]



Montagem da RNA-polimerase e fatores de transcrição em um promotor

A formação de um complexo fechado começa quando a proteína de ligação ao TATA (TBP) se liga ao TATA *box* (Figuras 26-9a, etapa ❶ e 26-9b). Em promotores sem TATA *box*, o TBP chega como parte de um complexo de múltiplas subunidades, chamado de TFIID; os elementos de sequência que direcionam a ligação de TFIID a esses promotores sem TATA são pouco conhecidos. A TBP é ligada, por sua vez, pelo fator de transcrição TFIIB. O TFIIA, então, se liga e, juntamente com o TFIIB, ajuda a estabilizar o complexo TBP-DNA. A TFIIB fornece uma ligação importante para a DNA-polimerase II, e o complexo TFIIB-TBP é, em seguida, ligado por outro complexo, consistindo na TFIIF e na Pol II. A TFIIF ajuda a ligar a Pol II aos seus promotores, tanto pela interação com a TFIIB quanto reduzindo a ligação da polimerase a sítios inespecíficos no DNA. Finalmente, a TFIIE e a TFIIH se ligam para criar o complexo fechado. A TFIIH tem várias subunidades e inclui uma atividade de helicase de DNA que promove o desenrolamento do DNA próximo do sítio de início do RNA (um processo que requer a hidrólise de ATP), criando, assim, um complexo aberto (Figura 26-9a, etapa ❷). Contando todas as subunidades dos vários fatores (incluindo TFIIA e as subunidades de TFIID), este complexo de iniciação ativo pode ter mais de 50 polipeptídeos. Estudos estruturais feitos por Roger Kornberg e colaboradores forneceram uma visão mais detalhada da estrutura central da RNA-polimerase II durante o alongamento (Figura 26-9c).

Iniciação da fita de RNA e liberação do promotor A TFIIH tem uma função adicional durante a fase de iniciação. A atividade de cinase em uma de suas subunidades fosforila a Pol II em muitos locais no CTD (Figura 26-9a). Várias outras proteínas-cinase, incluindo a CDK9 (cinase 9 dependente de ciclina), que é parte do complexo pTEFb (fator positivo b de alongamento de transcrição), também fosforilam o CTD, principalmente nos resíduos de Ser da sequência de repetição do CTD. Isso provoca uma mudança conformacional geral no complexo, iniciando a transcrição. A fosforilação do CTD também é importante durante a fase de alongamento subsequente, com o estado de fosforilação do CTD mudando à medida que a transcrição prossegue. As mudanças afetam as interações entre o complexo de transcrição e outras proteínas e enzimas, de modo que diferentes conjuntos de proteínas são ligados na iniciação, em vez de em estágios posteriores. Algumas dessas proteínas estão envolvidas no processamento do transcrito (como descrito a seguir).

Durante a síntese dos 60 a 70 nucleotídeos iniciais de RNA, primeiro TFIIE é liberado, seguido pelo TFIIH, e a Pol II entra na fase de alongamento da transcrição.

Alongação, terminação e liberação TFIIF permanece associado com a Pol II durante o alongamento. Durante esse estágio, a atividade da polimerase é bastante estimulada por proteínas chamadas de fatores de alongamento (Tabela 26-2). Os fatores de alongamento, alguns ligados ao CTD fosforilado, impedem a pausa durante a transcrição e coordenam as interações entre complexos de proteínas envolvidos no

processamento pós-transcricional de mRNA. Uma vez que o transcrito de RNA esteja completo, a transcrição é encerrada. A Pol II é desfosforilada e reciclada, pronta para iniciar outro transcrito (Figura 26-9a, etapas ❸ a ❺).

Regulação da atividade da RNA-polimerase II A regulação da transcrição nos promotores da Pol II é um processo elaborado. Ela envolve a interação de uma grande variedade de outras proteínas com o complexo de pré-iniciação. Algumas dessas proteínas regulatórias interagem com fatores de transcrição, outras com a própria Pol II. A regulação da transcrição é descrita em mais detalhes no Capítulo 28.

Diversas funções do TFIIH Em eucariotos, o reparo de DNA danificado (ver Tabela 25-5) é mais eficiente dentro de genes que estão sendo transcritos ativamente do que para outro DNA danificado, e a fita-molde é reparada de maneira mais eficiente do que a fita não molde. Essas observações impressionantes são explicadas pelos papéis alternativos das subunidades TFIIH. A TFIIH não só participa na formação do complexo fechado durante a montagem de um complexo de transcrição (como descrito anteriormente), mas algumas de suas unidades são também componentes essenciais do complexo de reparo separado de excisão de nucleotídeos (ver Figura 25-25).



Quando a transcrição da Pol II para no local de uma lesão de DNA, a TFIIH pode interagir com a lesão e recrutar todo o complexo de reparo de excisão de nucleotídeos. A perda genética de certas subunidades TFIIH pode produzir doenças humanas. Alguns exemplos são o xeroderma pigmentoso (ver Quadro 25-1) e a síndrome de Cockayne, caracterizada por interrupção do crescimento, fotossensibilidade e distúrbios neurológicos. ■

A RNA-polimerase DNA-dependente sofre inibição seletiva

O alongamento das fitas de DNA pela RNA-polimerase tanto em bactérias quanto em eucariotos é inibido pelo antibiótico **actinomicina D** (Figura 26-10). A porção planar dessa molécula se insere (intercala) no DNA dupla-hélice entre pares de bases G=C sucessivos, deformando o DNA. Isso impede o movimento da polimerase ao longo do molde. Como a actinomicina D inibe o alongamento de RNA em células intactas, bem como em extratos celulares, ela é usada para identificar processos celulares que dependem da síntese de RNA. A **acridina** inibe a síntese de RNA de modo semelhante.

A **rifampicina** inibe a síntese bacteriana de RNA ao se ligar à subunidade β das RNA-polimerases bacterianas, impedindo a etapa da transcrição de distanciamento do promotor (Figura 26-6). Algumas vezes é usada como antibiótico.

O cogumelo *Amanita phalloides* tem um mecanismo de defesa muito eficiente contra predadores. Ele produz **α -amanitina**, que interrompe a formação de mRNA nas células animais ao bloquear a Pol II e, em concentrações mais altas, a Pol III. Nem a Pol I nem a RNA-polimerase bacteriana são sensíveis à α -amanitina – nem a RNA-polimerase II do próprio *A. phalloides*!

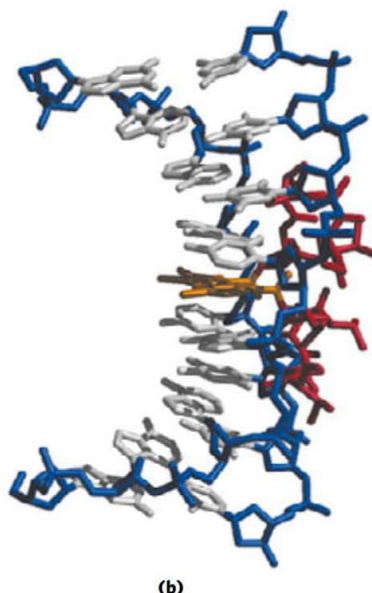
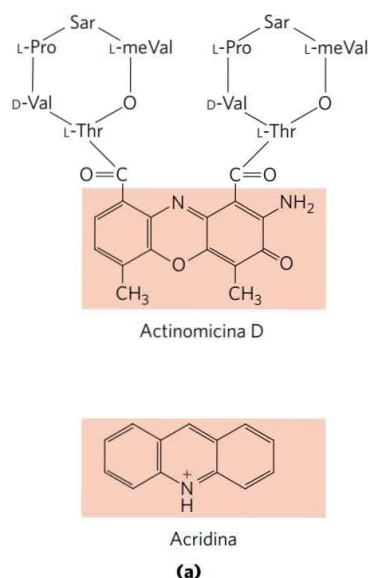


FIGURA 26-10 Actinomicina D e acridina, inibidores da transcrição do DNA.

(a) A porção sombreada da actinomicina D é planar e se intercala entre dois pares de bases sucessivos G≡C em um DNA duplex. As duas unidades de peptídeos cíclicos da actinomicina D se ligam ao sulco menor da dupla-hélice. Sarcosina (Sar) é *N*-metilglicina; meVal é metilvalina. A acridina também atua por intercalação no DNA. (b) Um complexo de actinomicina D com DNA. O esqueleto de DNA é mostrado em azul, as bases são brancas, a parte intercalada da actinomicina (sombreada em (a)) é cor de laranja, e o resto da actinomicina está em vermelho. O DNA é curvado como resultado da ligação da actinomicina. [Fonte: (b) PDB ID 1D5C, C. Lian et al., *J. Am. Chem. Soc.* 118:8791, 1996.]

RESUMO 26.1 Síntese de RNA dependente de DNA

- A transcrição é catalisada por RNA-polimerases dependentes de DNA, que usam ribonucleosídeo 5'-trifosfatos para sintetizar RNA complementar à fita-molde do DNA duplex. A transcrição ocorre em várias fases: ligação da RNA-polimerase a um sítio de DNA, chamado de promotor, iniciação da síntese do transcrito, alongamento e terminação.
- A RNA-polimerase bacteriana precisa de uma subunidade especial para reconhecer o promotor. Como primeiro passo envolvido na transcrição, a ligação da RNA-polimerase ao promotor e a iniciação da transcrição são intimamente regulados. A transcrição para em sequências chamadas de terminadores.
- As células eucarióticas têm três tipos de RNA-polimerases. A ligação da RNA-polimerase II aos seus promotores precisa de um conjunto de proteínas chamadas de fatores de transcrição. Os fatores de alongamento participam na fase de alongamento da transcrição. A maior subunidade de Pol II tem um longo domínio carboxiterminal que é fosforilado durante as fases de iniciação e alongamento.

26.2 Processamento de RNA

Muitas das moléculas de RNA em bactérias e praticamente todas as moléculas de RNA em eucariotos são processadas em algum grau após a síntese. Alguns dos eventos moleculares mais interessantes no metabolismo de RNA ocorrem durante esse processamento pós-síntese. De modo intrigante, várias das enzimas que catalisam essas reações consistem em RNA, em vez de proteína. A descoberta desses RNA catalíticos, ou **ribozimas**, trouxe uma revolução no pensamento a respeito da função do RNA e acerca da origem da vida.

Uma molécula de RNA recém-sintetizada é chamada de **transcrito primário**. Talvez o mais extenso processamento de transcritos primários ocorra nos mRNA de eucariotos e em tRNA tanto de bactérias quanto de eucariotos. Os RNA de função especial também são processados.

O transcrito primário para um mRNA eucariótico geralmente contém sequências envolvendo um gene, embora as sequências codificando o polipeptídeo possam não ser contíguas. Trechos não codificantes que interrompem a região codificadora do transcrito são chamados de íntrons, e os segmentos codificadores são chamados de éxons (ver discussão de íntrons e éxons no DNA no Capítulo 24). Em um processo chamado **splicing de RNA**, os íntrons são removidos do transcrito primário, e os éxons são ligados para formar uma sequência contínua que especifica um polipeptídeo funcional. Os mRNA de eucariotos também são modificados em cada extremidade. Um resíduo modificado, chamado de 5' cap, é adicionado à extremidade 5'. A extremidade 3' é clivada, e 80 a 250 resíduos A são adicionados para criar uma "cauda" poli(A). Os complexos proteicos algumas vezes elaborados que executam cada uma dessas três reações de processamento de mRNA não operam de modo independente. Eles parecem ser organizados em associação uns com os outros e com o CTD fosforilado da Pol II; cada complexo afeta a função dos outros. As proteínas envolvidas no transporte de mRNA para o citoplasma também são associadas ao mRNA no núcleo, e o processamento do transcrito é acoplado ao seu transporte. De fato, um mRNA eucariótico, à medida que é sintetizado, é codificado em um complexo elaborado envolvendo dúzias de proteínas. A composição do complexo varia à medida que o transcrito primário é processado, transportado para o citoplasma e entregue ao ribossomo para tradução. As proteínas associadas modulam todos os aspectos da função e do destino do mRNA. Esses processos são destacados na **Figura 26-11** e descritos em mais detalhes a seguir.

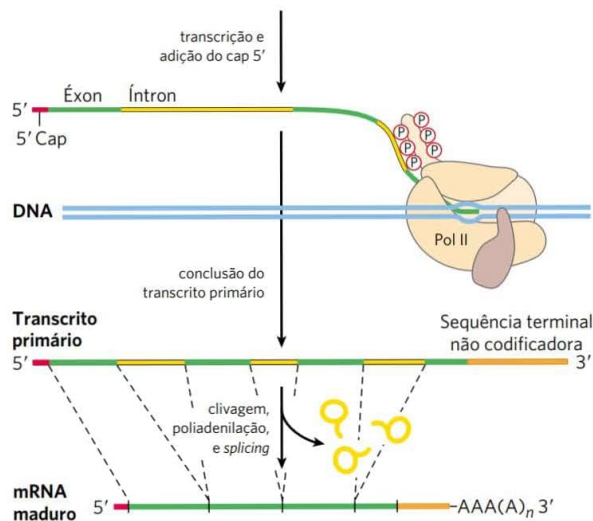


FIGURA 26-11 Formação do transcrito primário e seu processamento durante a maturação do mRNA em uma célula eucariótica. O 5' cap (em vermelho) é adicionado antes que a síntese do transcrito primário esteja completa. Uma sequência terminal não codificadora (intron) é mostrada em cor de laranja após o último éxon. O *splicing* pode ocorrer tanto antes quanto depois das etapas de clivagem e poliadenilação. Todos os processos aqui mostrados ocorrem no núcleo.

Os transcritos primários dos tRNA bacterianos e de eucariotos são processados pela remoção de sequências de cada extremidade (clivagem) e, em alguns poucos casos, pela remoção dos íntrons (*splicing*). Muitas bases e açúcares em tRNA também são modificados; os tRNA maduros são repletos de bases incomuns não encontradas em outros ácidos nucleicos (ver Figura 26-22). Muitos dos RNA de função especial também passam por processamento elaborado, frequentemente envolvendo a remoção de segmentos de uma ou ambas as extremidades.

O destino final de qualquer RNA é a completa e controlada degradação. A velocidade de reposição dos RNA desempenha um papel fundamental na determinação dos seus níveis estacionários e na taxa na qual as células podem interromper a expressão de um gene cujo produto não é mais necessário. Durante o desenvolvimento de organismos multicelulares, por exemplo, certas proteínas devem ser expressas apenas em um estágio, e o mRNA que codifica tal proteína deve ser produzido e destruído nos tempos adequados.

Os mRNA de eucariotos recebem um cap na extremidade 5'

A maioria dos mRNA de eucariotos tem um **5' cap**, um resíduo de 7-metilguanossina ligado ao resíduo 5'-terminal do mRNA por meio de uma rara ligação 5',5'-trifosfato (**Figura 26-12**). O 5' cap ajuda a proteger o mRNA das ribonucleases. Ele também se liga a um complexo específico de proteínas ligadoras de cap e participa da ligação do mRNA ao ribossomo para iniciar a tradução (Capítulo 27).

O 5' cap é formado pela condensação de uma molécula de GTP com o trifosfato na extremidade 5' do transcrito. Em seguida, a guanina é metilada no N-7, e grupos metil adicionais são frequentemente adicionados às hidroxilas

2' do primeiro e segundo nucleotídeos adjacentes ao cap (Figura 26-12a). Os grupos metil são derivados da S-adenosilmetionina. Todas essas reações (Figura 26-12b) ocorrem muito precocemente na transcrição, após os primeiros 20 a 30 nucleotídeos do transcrito terem sido adicionados. Todas as quatro enzimas no complexo sintetizador de cap, e, por meio delas, a extremidade 5' do próprio transcrito, são associadas ao CTD da RNA-polimerase II até que o cap seja sintetizado. A extremidade 5' com o cap é, então, liberada do complexo de síntese do cap e ligada pelo complexo de ligação do cap (Figura 26-12c).

O 5' cap não oferece proteção completa do transcrito. O vírus da gripe tem um genoma que consiste em oito segmentos de RNA de cadeia simples. Seus genes são transcritos por uma RNA-polimerase dependente de RNA codificada viralmente, um heterotrímero constituído pelas subunidades PA, PB1 e PB2. O vírus não precisa de enzimas especializadas para a síntese de 5' caps; em vez disso, ele usa essas estruturas de transcrições emprestadas de células hospedeiras em um processo denominado “captura do cap”. Um transcrito hospedeiro com o cap é ligado pela subunidade viral da polimerase PB2 e clivado por uma endonuclease na subunidade PA. A subunidade PB1 utiliza o resultante oligonucleotídeo com o cap para estimular a síntese de RNA viral.

Tanto íntrons quanto éxons são transcritos de DNA para RNA

Em bactérias, uma cadeia polipeptídica é geralmente codificada por uma sequência de DNA que é colinear com a sequência de aminoácido, continuando ao longo do molde de DNA sem interrupção até que a informação necessária para especificar o polipeptídeo seja completa. Entretanto, a noção de que *todos* os genes sejam contínuos foi desmentida em 1977, quando Phillip Sharp e Richard Roberts descobriram independentemente que muitos genes para polipeptídeos em eucariotos são interrompidos por sequências não codificadoras (íntrons).

A grande maioria dos genes em vertebrados contém íntrons; entre as poucas exceções estão aqueles que codificam histonas. A ocorrência de íntrons em outros eucariotos varia. Muitos genes da levedura *Saccharomyces cerevisiae* não têm íntrons, mas íntrons são mais comuns em algumas outras espécies de leveduras. Os íntrons também são encontrados em alguns poucos genes bacterianos e de arqueobactérias. Os íntrons do DNA são transcritos junto com o restante do gene pelas RNA-polimerases. Os íntrons no transcrito de RNA primário sofrem *splicing*, e os éxons são, então, ligados para formar um RNA maduro funcional. Em mRNA de eucariotos, a maioria dos éxons tem menos de 1.000 nucleotídeos de comprimento, com vários na faixa de tamanho de 100 a 200 nucleotídeos, codificando trechos de 30 a 60 aminoácidos no interior de um polipeptídeo mais longo. Os íntrons variam em tamanho de 50 a mais de 700 mil nucleotídeos, com um comprimento médio de cerca de 1.800. Os genes dos eucariotos superiores, incluindo os seres humanos, têm caracteristicamente muito mais DNA destinado a íntrons do que a éxons. Os aproximadamente 20 mil genes do genoma humano incluem mais do que 200 mil íntrons.

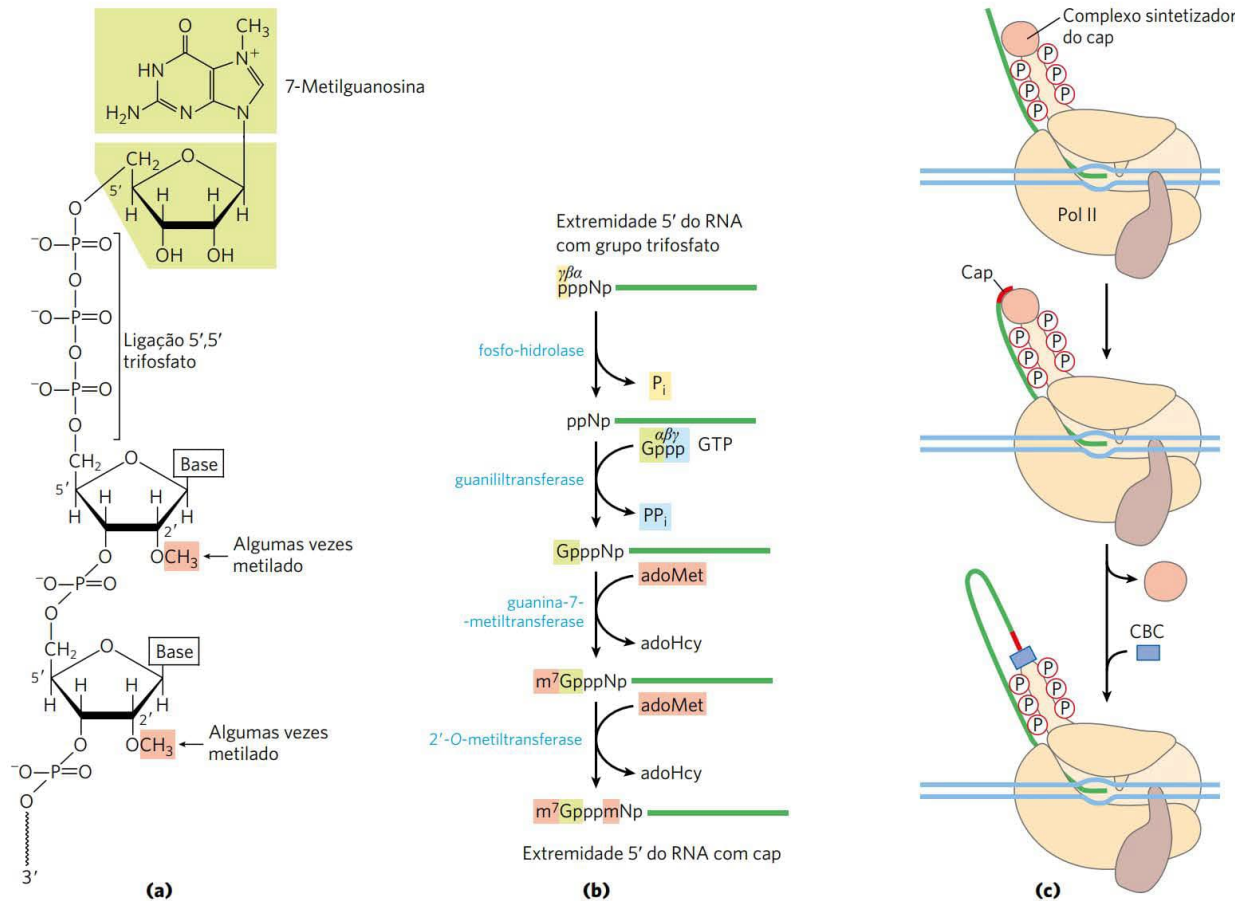


FIGURA 26-12 O 5' cap do mRNA. (a) 7-Metilguanósina (m^7G) é ligada à extremidade 5' de quase todos os mRNA eucarióticos em uma ligação incomum 5',5'-trifosfato. Os grupos metil (em cor salmão) são frequentemente encontrados na posição 2' do primeiro e do segundo nucleotídeos. Os RNA em células de leveduras não apresentam os grupos metil 2'. O grupo metil 2' no segundo nucleotídeo é geralmente encontrado apenas em RNA de células de vertebrados. (b) A produção do 5' cap requer quatro etapas separadas (adoHcy é S-adenosil-homocisteína). (c) A síntese do cap é feita por enzimas presas ao CTD da Pol II. O cap permanece preso ao CTD por meio de uma associação com o complexo de ligação do cap (CBC).

O RNA catalisa o *splicing* de íntrons

Há quatro classes de íntrons. As primeiras duas, os íntrons do grupo I e do grupo II, diferem em detalhes dos seus mecanismos de *splicing*, mas compartilham uma característica surpreendente: eles sofrem *autosplicing* – nenhuma enzima proteica está envolvida. Os íntrons do grupo I são encontrados em alguns genes nucleares, mitocondriais e de cloroplastos que codificam rRNA, mRNA e tRNA. Os íntrons do grupo II são geralmente encontrados em transcritos primários de mRNA mitocondriais ou de cloroplastos em fungos, algas e plantas. Os íntrons dos grupos I e II também são encontrados entre os raros exemplos de íntrons em bactérias. Nenhuma das classes precisa de um cofator de alta energia (como o ATP) para o *splicing*. Os mecanismos de *splicing* em ambos os grupos envolvem duas etapas de reações de transesterificação (**Figura 26-13**), em que um grupo ribose 2' ou 3'-hidroxila faz um ataque nucleofílico em um fósforo, e uma nova ligação fosfodiéster é formada às custas da antiga, mantendo o balanço energético. Essas reações são muito semelhantes às reações de quebra e religação do DNA

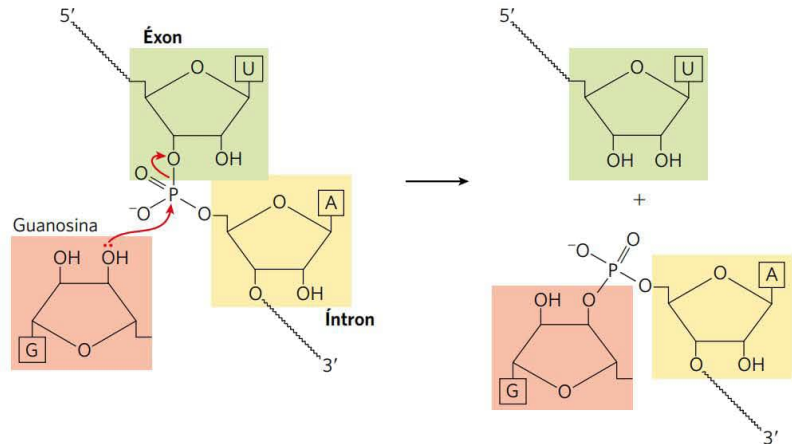
promovidas pelas topoisomerases (ver **Figura 24-19**) e recombinases sítio-específicas (ver **Figura 25-38**).

A reação de *splicing* do grupo I precisa do nucleosídeo guanina ou de um cofator nucleotídeo, porém o cofator não é usado como uma fonte de energia; em vez disso, o grupo 3'-hidroxila da guanosina é usado como um nucleófilo na primeira etapa da via do *splicing*. O grupo 3'-hidroxila da guanosina forma uma ligação 3'-fosfodiéster normal com a extremidade 5' do íntron (**Figura 26-14**). A 3'-hidroxila do éxon que é deslocada nessa etapa age, então, como um nucleófilo, em uma reação semelhante, na extremidade 3' do íntron. O resultado é a remoção precisa do íntron e a ligação dos éxons.

Nos íntrons do grupo II, o padrão de reação é semelhante, exceto pelo nucleófilo na primeira etapa, que, nesse caso, é o grupo 2'-hidroxila de um resíduo A dentro do íntron (**Figura 26-15**). Uma estrutura em laço ramificada é formada como um intermediário.

Os íntrons que sofrem *autosplicing* foram descobertos pela primeira vez, em 1982, em estudos do mecanismo de *splicing* do íntron do grupo I do rRNA do protozoário ciliado *Tetrahymena thermophila*, realizado por Thomas Cech

FIGURA 26-13 Reação de transesterificação. É mostrada aqui a primeira etapa do *splicing* de duas etapas dos íntrons do grupo I. Nesse exemplo, a 3'OH de uma molécula de guanosina atua como um nucleófilo, atacando a ligação fosfodiéster entre os resíduos U e A em uma junção éxon-íntron de uma molécula de mRNA (ver Figura 26-14).



Thomas Cech
[Fonte: foto tirada por Glenn Asakawa/University of Colorado.]

e colaboradores. Esses pesquisadores transcreveram o DNA isolado de *Tetrahymena* (incluindo o íntron) *in vitro*, usando a RNA-polimerase bacteriana purificada. O RNA resultante sofreu *autosplicing* de modo preciso sem quaisquer proteínas enzimáticas da *Tetrahymena*. A descoberta de que os RNA poderiam ter funções catalíticas foi um marco em nossa compreensão dos sistemas biológicos e um grande passo à frente no entendimento de como a vida provavelmente evoluiu.

Em eucariotos, a maioria dos íntrons é submetida ao *splicing* pelo mesmo mecanismo de formação de laço que o íntron do grupo II. No entanto, o *splicing* do íntron ocorre dentro de um grande complexo de proteínas, chamado de **espliceossomo**, e esses íntrons, os **íntrons do espliceossomo**, não são atribuídos a um grupo. Um espliceossomo é composto por muitos complexos especializados de RNA-proteína, denominados pequenas ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs, frequentemente pronunciados “*snurps*”). Cada snRNP contém uma classe de RNA eucariótico, de 100 a 200 nucleotídeos de comprimento, conhecida como **RNA nucleares pequenos (snRNA)**. Cinco snRNA (U1, U2, U4, U5 e U6) envolvidos nas reações de *splicing* são geralmente encontrados em abundância nos núcleos de eucariotos. Em levedura, as várias snRNP incluem cerca de 100 proteínas diferentes, a maioria das quais possui homó-

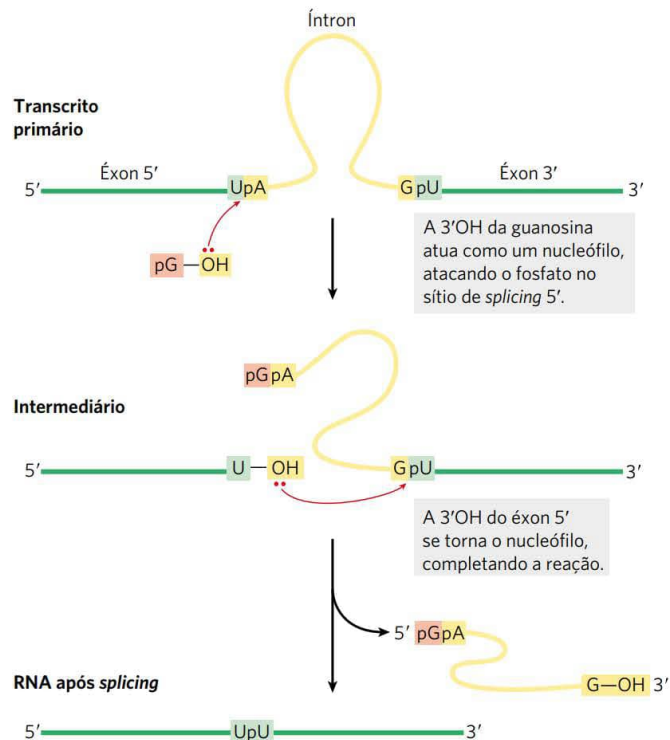


FIGURA 26-14 Mecanismo de *splicing* de íntrons do grupo I. O nucleófilo na primeira etapa pode ser guanosina, GMP, GDP ou GTP. O íntron que sofre *splicing* acaba degradado.

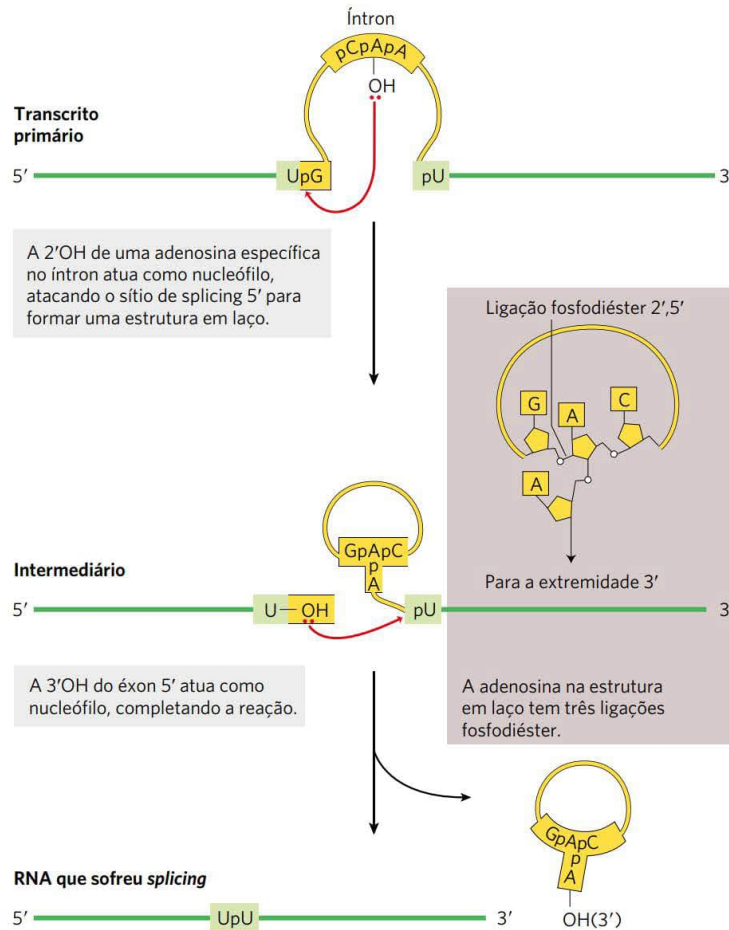


FIGURA 26-15 O mecanismo de *splicing* dos íntrons do grupo II. A química é semelhante àquela do *splicing* dos íntrons do grupo I, exceto pela identidade do nucleófilo na primeira etapa e a formação de um intermediário em laço, em que um ramo é uma ligação fosfodiéster 2',5'.

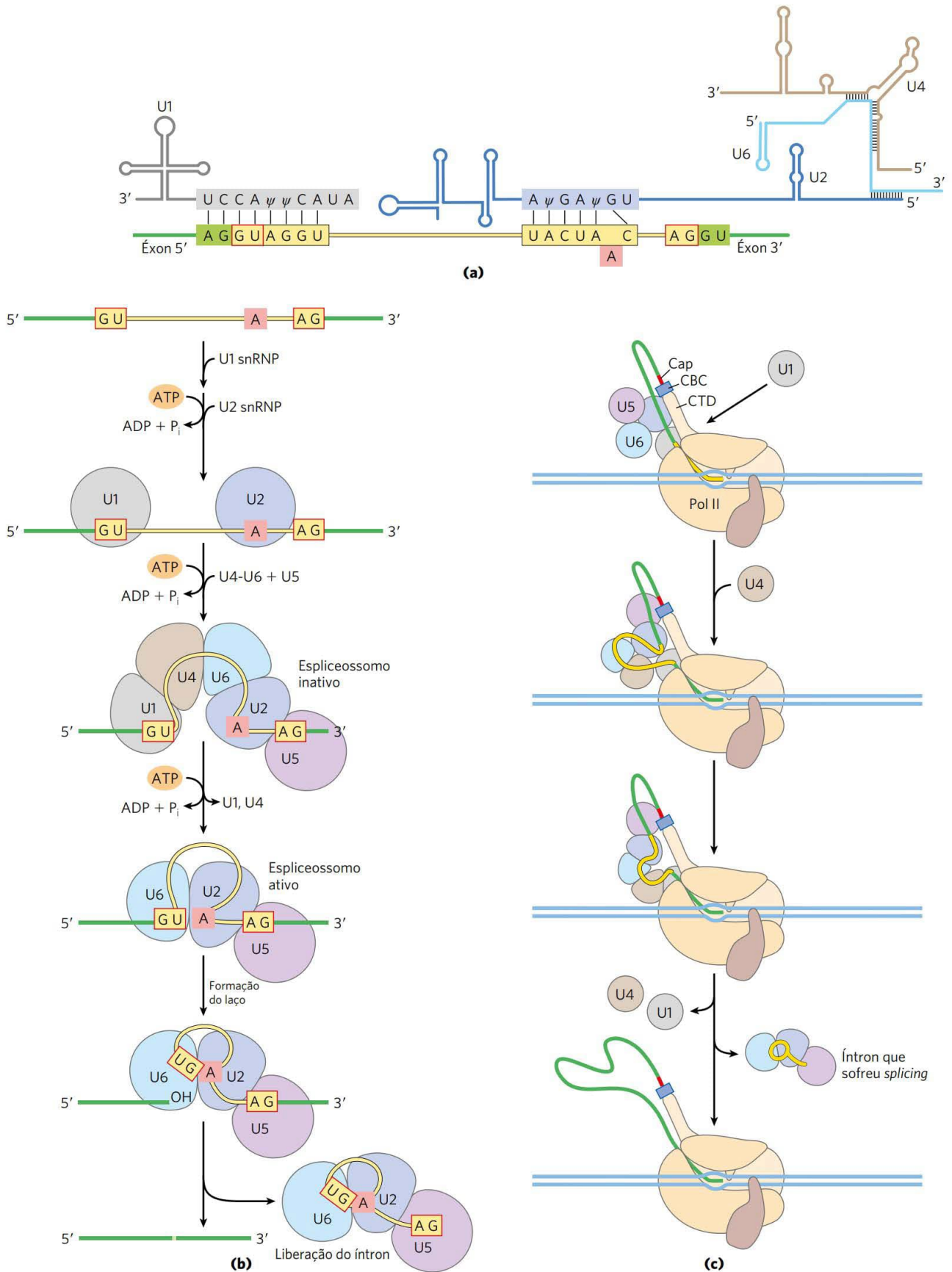
logos próximos em todos os outros eucariotos. Em seres humanos, esses componentes proteicos conservados apresentam mais de 200 proteínas adicionais. Os espliceossomos estão, portanto, entre as máquinas macromoleculares mais complexas em qualquer célula eucariótica. Os componentes de RNA de um espliceossomo são os catalisadores dos vários passos de *splicing*. O complexo global pode ser considerado uma chaperona nucleoproteica altamente flexível que pode se adaptar à grande diversidade em tamanho e sequência de mRNA nucleares.

Os íntrons do espliceossomo geralmente têm a sequência de dinucleotídeos GU na extremidade 5' e AG na extremidade 3', e essas sequências marcam os sítios em que o *splicing* ocorre. O snRNA U1 contém uma sequência complementar às sequências próximas do sítio de *splice* 5' dos íntrons do mRNA nuclear (**Figura 26-16a**), e snRNP U1 se liga à essa região no transcrito primário. Um snRNP U2 liga-se à extremidade 3'. A adição das snRNPs U4, U5 e U6 leva à formação do espliceossomo (**Figura 26-16b**). As partes-chave do sítio ativo de processamento encontrado em U6 são inicialmente sequestradas por pareamento de bases, com partes de U4 para impedir a clivagem aberrante de ligações fosfodiéster que não são o alvo. Os snRNA U6 e U4 devem ser desenrolados e separados para expor o sítio ativo necessário para o primeiro passo no *splicing*. Todas as etapas do processo são reversíveis. Proteínas individuais associadas às várias snRNP às vezes têm funções múltiplas:

splicing, transporte do mRNA para o citoplasma, tradução e eventual degradação do mRNA. É necessário ATP para a montagem do espliceossomo, mas as reações de clivagem-ligação do RNA não parecem precisar de ATP. Alguns íntrons de mRNA sofrem *splicing* por um tipo menos comum de espliceossomo, no qual os snRNP U1 e U2 são substituídos pelos snRNP U11 e U12. Enquanto os espliceossomos contendo U1 e U2 removem íntrons com sequências terminais (5')GU e AG(3'), como mostrado na **Figura 26-16**, os espliceossomos que contêm U11 e U12 removem um tipo raro de íntrons que têm sequências terminais (5')AU e AC(3') para marcar os sítios de *splice* nos íntrons.

Alguns dos componentes do aparato de *splicing* estão presos ao CTD da RNA-polimerase II, indicando que o *splicing*, como outras reações de processamento de RNA, é fortemente coordenado com a transcrição (**Figura 26-16c**). Assim que a primeira junção *splice* é sintetizada, ela é ligada por um espliceossomo preso. A segunda junção *splice* é, então, capturada por esse complexo à medida que ela passa, facilitando a justaposição das extremidades do íntron e o processo de *splicing* subsequente. Após o *splicing*, o íntron permanece no núcleo e, depois, é degradado.

Os espliceossomos usados na emenda do RNA nuclear quase certamente evoluíram dos íntrons mais antigos do grupo II, com as snRNP contribuindo com níveis muito maiores de flexibilidade e regulação catalítica em relação aos seus ancestrais de *autosplicing*.



Uma quarta e última classe de íntrons, encontrada em certos tRNA, distingue-se dos íntrons do grupo I e II, na medida em que a reação de processamento requer ATP e uma endonuclease. A endonuclease de *splicing* cliva as ligações fosfodiéster em ambas as extremidades do íntron, e os dois éxons são ligados por um mecanismo semelhante à reação da DNA-ligase (ver Figura 25-16).

Embora os íntrons do espliceossomo pareçam ser limitados a eucariotos, as outras classes de íntrons não o são. Genes com íntrons dos grupos I e II foram agora encontrados tanto em bactérias quanto em vírus bacterianos. O bacteriófago T4, por exemplo, tem vários genes codificadores de proteínas com íntrons do grupo I. Os íntrons podem ser mais comuns em arqueobactérias do que em bactérias.

Os mRNA de eucariotos têm uma estrutura da extremidade 3' característica

Na extremidade 3', a maioria dos mRNA eucarióticos submetidos à tradução no citoplasma da célula possui uma cadeia de resíduos de A, com cerca de 30 resíduos em levedura e 50 a 100 em animais, denominada **cauda poli(A)**. Essa cauda serve como um sítio de ligação para uma ou mais proteínas específicas. A cauda poli(A) e as suas proteínas associadas têm uma variedade de papéis na coordenação da transcrição e da tradução, e podem ajudar a proteger o mRNA da destruição enzimática. Muitos mRNA bacterianos também adquirem caudas poli(A), porém essas caudas estimulam a destruição do mRNA, em vez de protegê-lo da degradação.

A cauda poli(A) é adicionada em um processo de várias etapas. O transcrito se estende além do local em que a cauda poli(A) deve ser adicionada, é clivado no local de adição de poli(A) por um componente de endonuclease de um grande complexo enzimático e é novamente associado ao CTD da RNA-polimerase II (Figura 26-17). O local do mRNA em que a clivagem ocorre é marcado por dois elementos de sequência: a sequência altamente conservada (5')AAUAAA(3'), de 10 a 30 nucleotídeos no lado 5' (a montante) do sítio de clivagem, e uma sequência menos bem de-

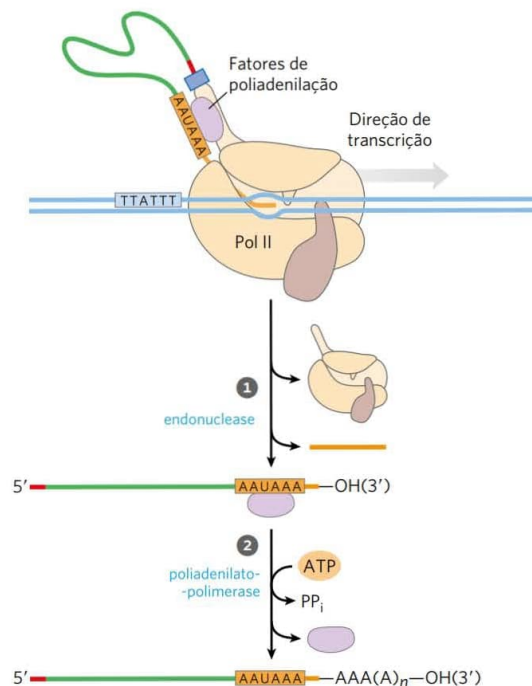


FIGURA 26-17 Adição da cauda de poli(A) ao transcrito do RNA primário de eucariotos. A Pol II sintetiza RNA além do segmento do transcrito contendo as sequências de sinalização de clivagem, incluindo a sequência a montante (5')AAUAAA altamente conservada. Essa sequência de sinalização de clivagem está ligada por um complexo enzimático que inclui uma endonuclease, uma poliadenilato-polimerase e várias outras proteínas multissubunidades envolvidas no reconhecimento de sequências, estimulação da clivagem e regulação do comprimento da cauda de poli(A), todos ligados ao CTD. 1 O RNA é clivado pela endonuclease em um ponto 10 a 30 nucleotídeos na direção 3' (a jusante) da sequência AAUAAA. 2 A poliadenilato-polimerase sintetiza uma cauda poli(A) de 80 a 250 nucleotídeos de comprimento, começando no sítio de clivagem.

finida, rica em resíduos de G e U, de 20 a 40 nucleotídeos a jusante do local da clivagem. A clivagem gera o grupo 3'-hidroxila livre que define a extremidade do mRNA, à qual os resíduos de A são imediatamente adicionados pela **poliadenilato-polimerase**, que catalisa a reação



em que $n = 80$ a 250. Essa enzima não precisa de um molde, mas exige o mRNA clivado como um iniciador. Estas longas caudas poli(A) são adicionadas ao núcleo e, depois, encurtadas significativamente após o transporte do mRNA para o citoplasma.

O processamento geral de um típico mRNA eucariótico está resumido na Figura 26-18. Em alguns casos, a região codificadora de polipeptídeos do mRNA também é modificada pela “edição” do RNA (mais detalhes na Seção 27.1). Esta edição inclui processos que adicionam ou eliminam bases nas regiões de codificação de transcritos primários ou que alteram a sequência (como por desaminação enzimática de um resíduo C para criar um resíduo U). Um exemplo particularmente drástico ocorre em tripanossomos, que são protozoários parasitas: grandes regiões de um mRNA são sintetizadas sem qualquer uridilato, e os resíduos U são inseridos posteriormente por edição de RNA.

FIGURA 26-16 Mecanismo de *splicing* nos transcritos do mRNA primário. (a) Interações de pareamento do RNA na montagem dos complexos de espliceossomos. O snRNA U1 tem uma sequência próxima de sua extremidade 5' que é complementar ao sítio de *splicing* na extremidade 5' do íntron. O pareamento de bases do U1 com essa região ajuda a definir o sítio de *splicing* 5' durante a formação do espliceossomo (γ é a pseudouridina; ver Figura 26-22). O U2 é pareado ao íntron em uma posição que envolve o resíduo A (sombreado em cor salmão) que se torna o nucleófilo durante a reação de *splicing*. O pareamento de bases do snRNA U2 provoca a formação de uma protuberância que desloca e ajuda a ativar o adenilil, cuja 2'OH formará a estrutura em laço por meio de ligação fosfodiéster 5'. (b) Montagem dos espliceossomos. Todas as etapas são reversíveis, mas estão mostradas prosseguindo na direção para a frente para simplificar. Os snRNP U1 e U2 se ligam e, então, os snRNP restantes (complexo U4-U6 e U5) se ligam para formar um espliceossomo inativo. Os rearranjos internos convertem essa espécie em um espliceossomo ativo, no qual U1 e U4 foram expulsos e U6 está pareado tanto com o sítio de *splicing* 5' quanto com o U2. Em seguida, ocorrem as etapas catalíticas, que são semelhantes àsquelas do *splicing* dos íntrons do grupo II (ver Figura 26-15). O complexo do espliceossomo ativo está ilustrado na capa deste livro. (c) A coordenação do *splicing* e a transcrição fazem os dois sítios de *splicing* ficarem juntos. Ver mais detalhes no texto. Todas as etapas são reversíveis. O espliceossomo tem mais do que o dobro do tamanho da RNA-polimerase II.

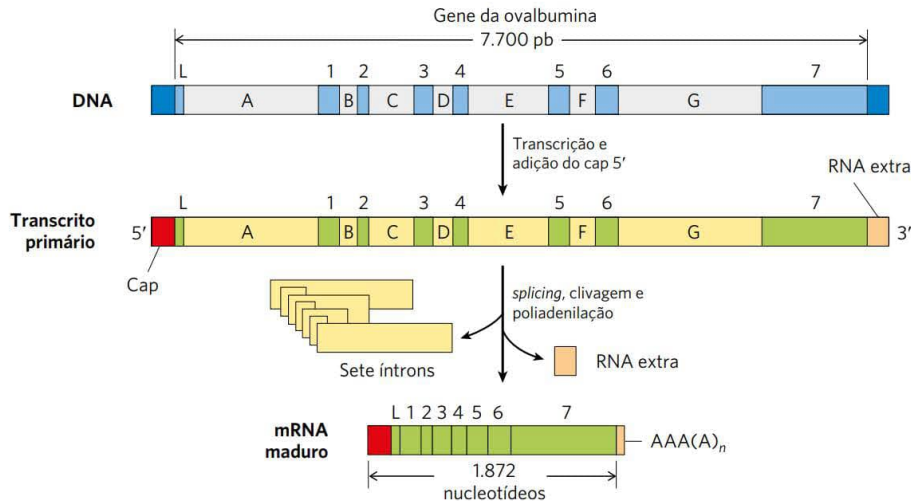


FIGURA 26-18 Visão geral do processamento de um mRNA eucariótico. O gene da ovalbumina, mostrado aqui, tem introns A a G e éxons 1 a 7 e L (o L codifica uma sequência de peptídeo sinalizador que tem como alvo a proteína de exportação da célula; ver Figura 27-40). Cerca de três quartos do RNA são removidos durante o processamento. A Pol II estende o transcrito primário bem além da clivagem e do sítio de poliadenilação ("RNA extra") antes de terminar a transcrição. Os sinais de terminação para a Pol II ainda não foram definidos.

Um gene pode dar origem a vários produtos por meio do processamento diferencial do RNA

Um dos paradoxos da genômica moderna é que a complexidade aparente dos organismos não se correlaciona com o número de genes codificadores de proteínas ou mesmo com a quantidade de DNA genômico. Alguns transcritos de mRNA eucarióticos podem ser processados por mais de uma maneira para produzir *diferentes* mRNA e, assim, diferentes polipeptídeos. Grande parte da variabilidade no processamento é o resultado de **splicing alternativo**, no

qual um éxon específico pode ou não ser incorporado ao transcrito de mRNA maduro. O *splicing* alternativo ocorre em um número relativamente pequeno de genes em levedura, porém em mais de 95% dos genes humanos.

A **Figura 26-19a** ilustra como os padrões de *splicing* alternativo podem produzir mais de uma proteína a partir

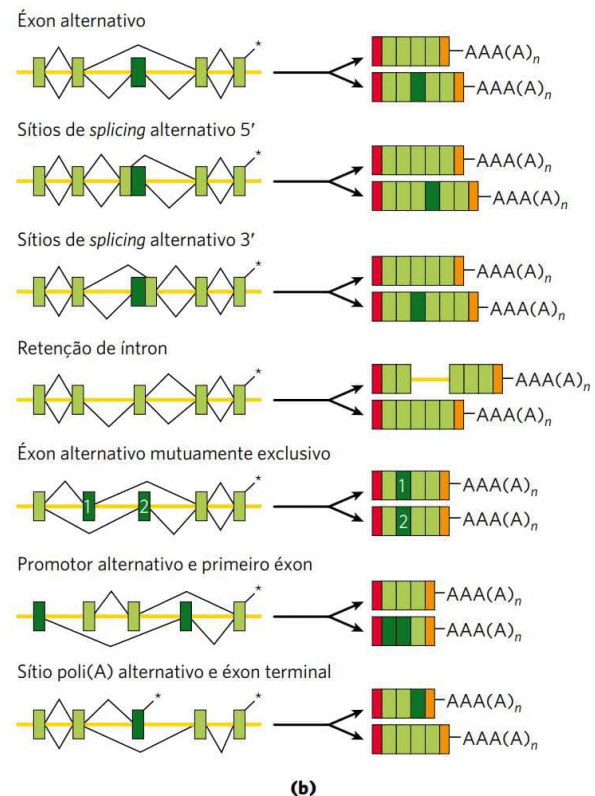
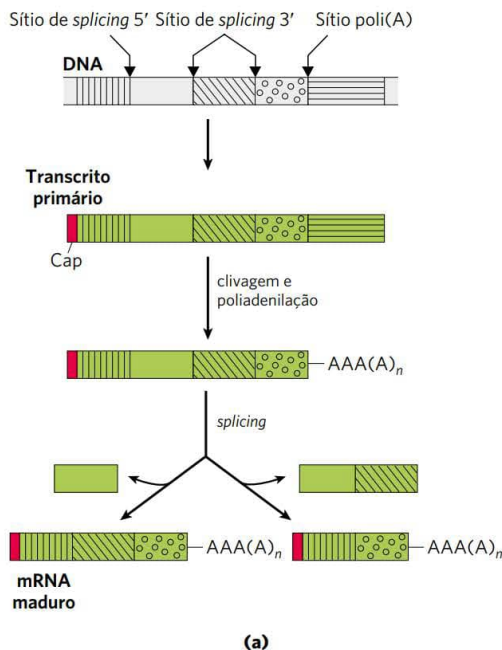


FIGURA 26-19 *Splicing* alternativo em eucariotos. (a) Padrões de *splicing* alternativos. Dois sítios de *splicing* 3' diferentes são mostrados. Os mRNA maduros diferentes são produzidos a partir do mesmo transcrito primário. (b) Resumo de padrões de *splicing*. Os éxons são mostrados em tons de verde, e os introns/as regiões não traduzidas(as), como linhas amarelas. Posições em que a poliadenosina será adicionada são marcadas com asteriscos. Os éxons ligados em um esquema de *splicing* específico são ligados com linhas pretas. Para cada transcrito, os padrões de ligação alternativos mostrados acima e abaixo do transcrito produzem o mRNA processado na parte superior e na parte inferior, respectivamente. Nos produtos, os caps 5' são representados por caixas vermelhas, e as regiões 3' não traduzidas, por caixas laranjas. [Fonte: (b) informação de B. J. Blencowe, *Cell* 126:37, 2006, Figura 2.]

de um transcrito primário comum. O transcrito primário contém sinais moleculares para todas as vias de processamento alternativo, e a via favorecida em uma célula é determinada por fatores de processamento, proteínas ligadoras de RNA que promovem uma via específica. Por exemplo, a composição proteica das snRNP envolvidas no *splicing* pode variar um pouco nos spliceossomos que participam no processamento de genes diferentes, e pode mudar ainda mais, de modo que o processamento de um gene específico é alterado em diferentes estágios de desenvolvimento animal. Como exemplo, esse processamento alternativo produz três formas diferentes da cadeia pesada da miosina em diferentes fases do desenvolvimento da mosca-das-frutas. Existem muitos padrões adicionais de *splicing* alternativo (Figura 26-19b).

Transcritos complexos também podem ter mais de um sítio onde as caudas poli(A) podem se formar. Se há dois ou mais sítios de clivagem e poliadenilação, o uso daquele mais próximo da extremidade 5' removerá mais da sequência do transcrito primário (Figura 26-20). Esse mecanismo, chamado de **escolha do sítio de poli(A)**, produz diversidade nos domínios variáveis das cadeias pesadas da imunoglobulina (ver Figura 25-43).

Ambos, *splicing* alternativo e escolha do sítio poli(A), entram em jogo no processamento de muitos genes. Por exemplo, um único transcrito de RNA é processado usando ambos os mecanismos para produzir dois hormônios diferentes: o hormônio regulador de cálcio calcitonina na tireoide de ratos e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) no cérebro de ratos (Figura 26-21). Juntos, o *splicing* alternativo e a escolha do sítio poli(A) aumentam muito o número de proteínas diferentes geradas a partir dos genomas de eucariotos superiores.

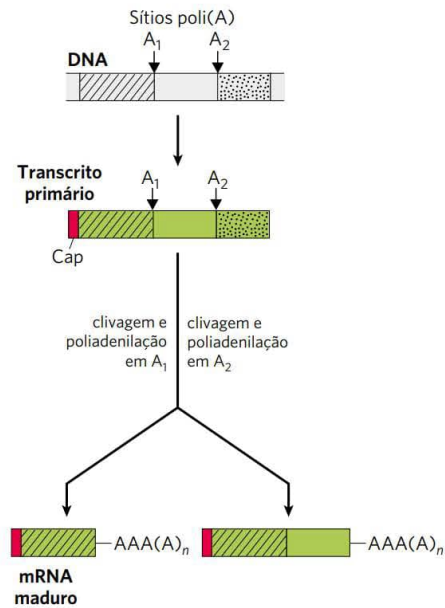


FIGURA 26-20 Escolha do sítio poli(A). Dois sítios alternativos de clivagem e sítios de poliadenilação, A₁ e A₂, são mostrados.

RNA ribossômicos e tRNA também sofrem processamento

O processamento pós-transcricional não é limitado ao mRNA. Os RNA ribossômicos de bactérias, arqueobactérias e células eucarióticas são feitos de precursores maiores, chamados de **RNA pré-ribossômicos**, ou pré-rRNA. Os RNA transportadores são, do mesmo modo, derivados de precursores maiores. Esses RNA também podem contar

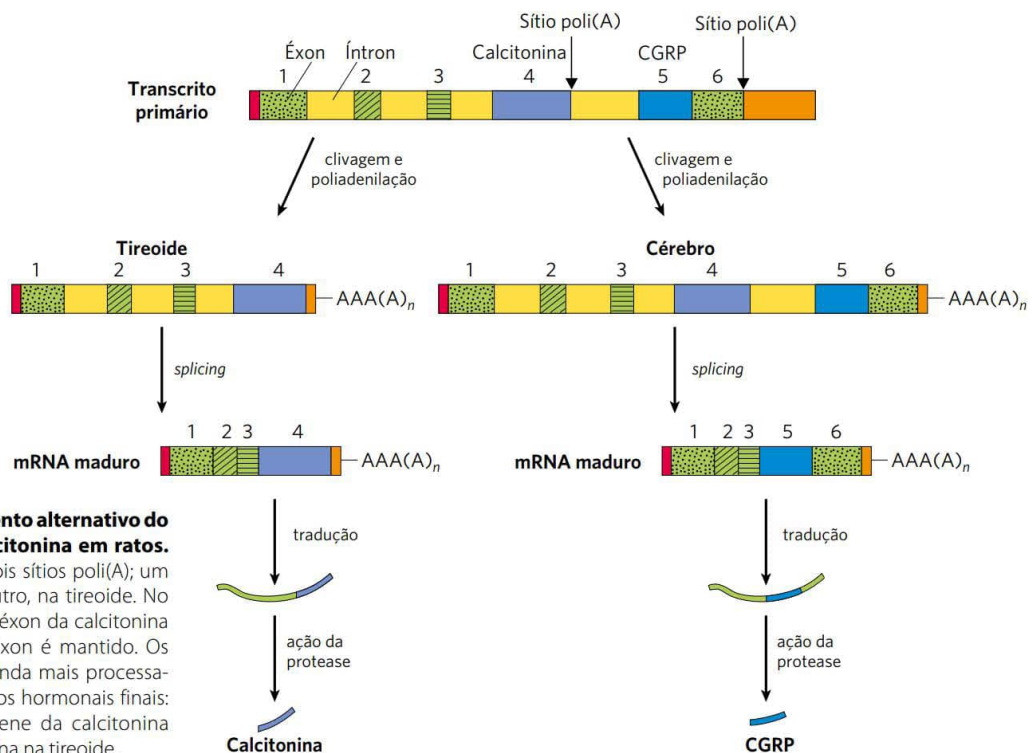


FIGURA 26-21 Processamento alternativo do transcrito do gene da calcitonina em ratos.

O transcrito primário tem dois sítios poli(A); um predomina no cérebro, o outro, na tireoide. No cérebro, o *splicing* elimina o éxon da calcitonina (éxon 4); na tireoide, este éxon é mantido. Os peptídeos resultantes são ainda mais processados para fornecer os produtos hormonais finais: peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) no cérebro e calcitonina na tireoide.

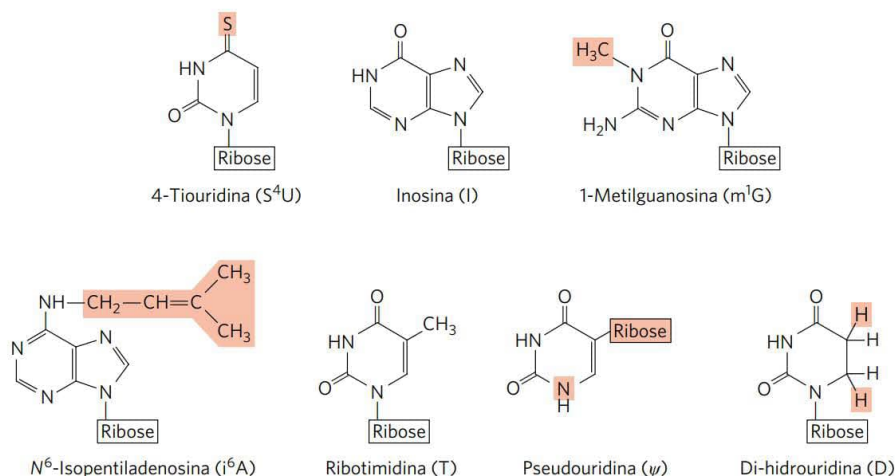


FIGURA 26-22 Algumas bases modificadas de rRNA e tRNA, produzidas em reações pós-transcricionais. Observe o ponto de fixação incomum da ribose na pseudouridina. Os símbolos-padrão são mostrados entre parênteses. Isso é apenas uma pequena amostragem dos 96 nucleosídeos modificados que ocorrem em diferentes espécies de RNA, com 81 tipos diferentes conhecidos em tRNA e 30 observados até agora em rRNA. A listagem completa dessas bases modificadas pode ser encontrada no banco de dados Modomics de vias de modificação de RNA (<http://modomics.genesilico.pl>).

vários nucleosídeos modificados; alguns exemplos são mostrados na **Figura 26-22**.

RNAs ribossômicos Em bactérias, rRNA 16S, 23S e 5S (e alguns tRNA, embora a maioria deles seja codificada em outro lugar) surgem a partir de um único precursor de RNA 30S de cerca de 6.500 nucleotídeos. Os RNA de ambas as extremidades do precursor 30S e os segmentos entre os rRNA são removidos durante o processamento (**Figura 26-23**). Os rRNA 16S e 23S contêm nucleosídeos modificados. Em *E. coli*, as 11 modificações no rRNA 16S incluem uma pseudopurina e 10 nucleosídeos metilados na base, no grupo 2'-hidroxila ou em ambos. O rRNA 23S tem 10 pseudopurinas, 1 di-hidrouridina e 12 nucleosídeos metilados. Em bactérias, cada modificação é geralmente catalisada por uma

enzima diferente. As reações de metilação usam a *S*-adenosilmetionina como cofator. Nenhum cofator é necessário para a formação de pseudouridina.

O genoma da *E. coli* codifica sete moléculas pré-rRNA. Todos esses genes são essencialmente regiões codificadoras idênticas de rRNA, mas diferem nos segmentos entre essas regiões. O segmento entre os genes de rRNA 16S e 23S geralmente codifica um ou dois tRNA, com diferentes tRNA produzidos a partir de diferentes transcritos de pré-rRNA. As sequências codificadoras para tRNA também são encontradas no lado 3' do rRNA 5S em alguns transcritos precursores.

A situação em eucariotos é mais complicada. Um transcrito do pré-rRNA 45S é sintetizado pela RNA-polimerase I e processado no nucléolo para formar os rRNA 18S, 28S e 5,8S característicos dos ribossomos de eucariotos (**Figura 26-**

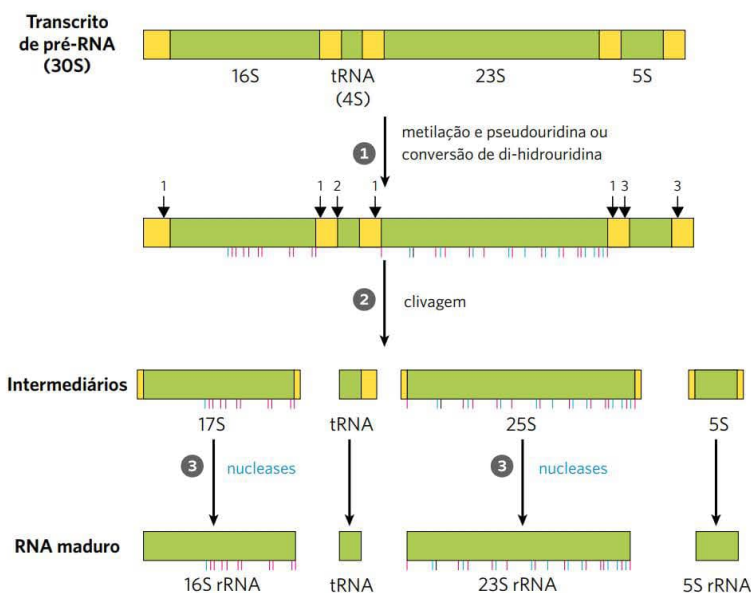


FIGURA 26-23 Processamento dos transcritos de pré-rRNA em bactérias. 1 Antes da clivagem, o precursor do RNA 30S é metilado em bases específicas (traços cor-de-rosa) e alguns resíduos de uridina são convertidos em pseudouridina (traços azuis) ou resíduos de di-hidrouridina (traços pretos). As reações de metilação são de tipos variados, alguns ocorrendo em bases e alguns em grupos 2'-hidroxila. 2 A clivagem libera precursores de rRNA e tRNA. A clivagem nos pontos marcados 1, 2 e 3 é realizada pelas enzimas RNase III, RNase P e RNase E, respectivamente. Como discutido posteriormente no texto, a RNase P é uma ribozima. 3 Os produtos finais rRNA 16S, rRNA 23S e rRNA 5S resultam da ação de uma variedade de nucleases específicas. As sete cópias do gene pré-rRNA no cromossomo de *E. coli* diferem em número, localização e identidade dos tRNA incluídos no transcrito primário. Algumas cópias do gene têm segmentos de genes de tRNAs adicionais entre os segmentos de rRNA 16S e 23S e na extremidade 3' do transcrito primário.

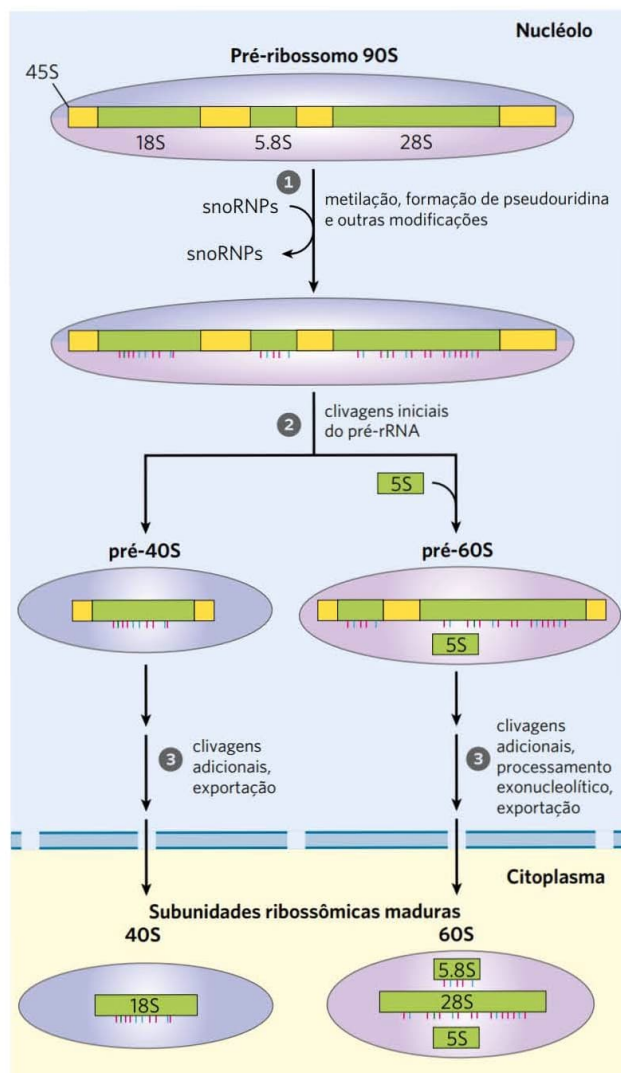


FIGURA 26-24 Processamento dos transcritos de pré-rRNA em vertebrados. Durante a transcrição, o transcrito primário 45S é incorporado em um complexo pré-ribossômico 90S nucleolar, em que o processamento do rRNA e a montagem do ribossomo são fortemente associados. ① O precursor 45S é metilado em mais de 100 dos seus 14 mil nucleotídeos, ou nas bases ou nos grupos 2'-OH (traços cor-de-rosa), algumas uridinas são convertidas em pseudouridinas (traços azuis) e algumas poucas outras modificações ocorrem (traços verdes são di-hidrouridinas). ②, ③ Uma série de clivagens enzimáticas do precursor 45S produz os rRNA 18S, 5.8S e 28S, e as subunidades ribossômicas gradualmente ganham forma com a montagem das proteínas ribossômicas. As reações de clivagem e todas as modificações precisam de RNA nucleolares pequenos (snoRNA), encontrados em complexos proteicos (snoRNP) no nucléolo que lembram os spliceossomos. O rRNA 5S é produzido separadamente.

24). Como nas bactérias, o processamento inclui reações de clivagem mediadas por endo ou exorribonucleases e reações de modificação de nucleosídeos. Alguns pré-RNA também incluem íntrons que devem passar pelo mecanismo de *splicing*. Todo o processo é iniciado no nucléolo, em grandes complexos que se reúnem no precursor de rRNA à medida que ele é sintetizado pela Pol I. Há uma forte ligação entre

a transcrição de rRNA, a maturação de rRNA e a montagem do ribossomo no nucléolo. Cada complexo inclui as ribonucleases que clivam o precursor de rRNA, as enzimas que clivam bases específicas, um grande número de **RNA nucleolares pequenos**, ou **snoRNA**, que guiam a modificação de nucleosídeos e algumas reações de clivagem, e proteínas ribossômicas. Em leveduras, todo o processo envolve o pré-rRNA, mais de 170 proteínas não ribossômicas, um conjunto de snoRNA para cada modificação de nucleosídeos (cerca de 70 no total, uma vez que alguns snoRNA guiam dois tipos de modificações) e as 78 proteínas ribossômicas. Os seres humanos têm um número ainda maior de nucleosídeos modificados, cerca de 200, e um número maior de snoRNA associados. A composição dos complexos pode mudar à medida que os ribossomos são montados e vários dos complexos intermediários podem competir em complexidade com o próprio ribossomo e as snRNP. O rRNA 5S da maioria dos eucariotos é produzido como um transcrito inteiramente separado, por uma polimerase diferente (Pol III).

As modificações de nucleosídeos mais comuns no rRNA de eucariotos são, mais uma vez, a conversão de uridina em pseudouridina e metilação de nucleosídeos dependente de adoMet (frequentemente em grupos 2'-hidroxila). Essas reações dependem de complexos de proteínas snoRNA, ou **snoRNP**, cada uma consistindo em um snoRNA e quatro ou cinco proteínas, que inclui a enzima que provoca a modificação. Há duas classes de proteínas snoRNP, ambas definidas pelos elementos de sequência-chave conservados, denominados por caixas com letras. As snoRNP da caixa H/AcA estão envolvidas na pseudouridililação, e as snoRNP da caixa C/D, nas metilações 2'-O. Ao contrário da situação em bactérias, a mesma enzima pode participar de modificações em vários locais, guiadas pelos snoRNA.

Os snoRNA têm de 60 a 300 nucleotídeos de comprimento. Muitos são codificados no interior dos íntrons e de outros genes e cotranscritos com aqueles genes. Cada snoRNA inclui uma sequência de 10 a 21 nucleotídeos que é perfeitamente complementar a algum local em um rRNA. Os elementos da sequência conservada no resto do snoRNA se dobra em estruturas que são ligadas pelas proteínas snoRNP (Figura 26-25).

RNA transportadores A maioria das células tem de 40 a 50 tRNA diferentes, e as células eucarióticas têm muitas cópias de vários genes de tRNA. Os RNA transportadores são derivados de precursores de RNA mais longos pela remoção enzimática de nucleotídeos das extremidades 5' e 3' (Figura 26-26). Em eucariotos, os íntrons estão presentes em poucos transcritos de tRNA e devem ser retirados. Quando dois ou mais tRNA diferentes estão contidos em um único transcrito primário, eles são separados por clivagem enzimática. A endonuclease RNase P, encontrada em todos os organismos, remove o RNA na extremidade 5' dos tRNA. Essa enzima contém tanto proteína quanto RNA. O componente de RNA é essencial para a sua atividade e, em células bacterianas, ele pode desempenhar sua função de processamento com precisão mesmo sem o componente proteico. A RNase P é, portanto, outro exemplo de um RNA catalítico, como descrito com mais detalhes a seguir. A extremidade 3' dos tRNA é processada por uma ou mais nucleases, incluindo a exonuclease RNase D.

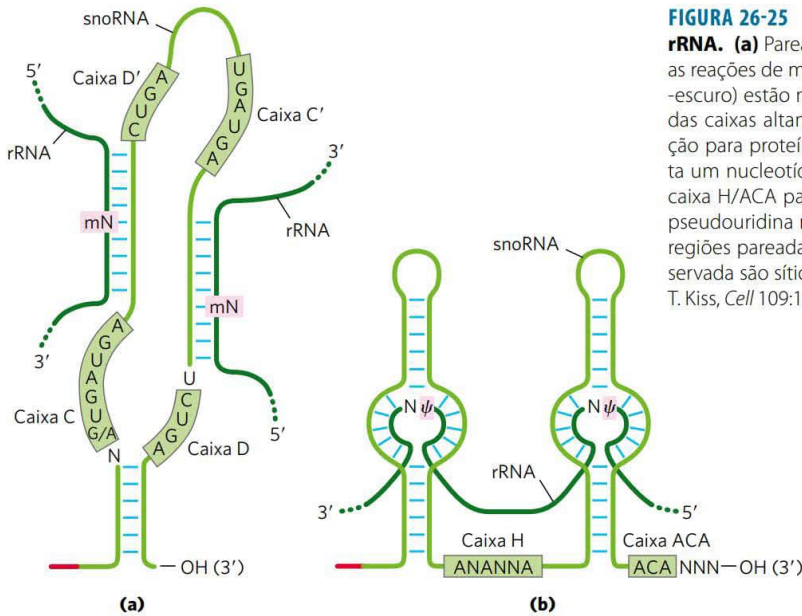


FIGURA 26-25 Função dos snoRNA em guiar a modificação do rRNA. (a) Pareamento do RNA com os snoRNA da caixa C/D para guiar as reações de metilação. Os sítios de metilação no rRNA-alvo (em verde-escuro) estão nas regiões pareadas com o snoRNA C/D. As sequências das caixas altamente conservadas C e D (e C' e D') são sítios de ligação para proteínas que compõem o snoRNP mais longo. mN representa um nucleotídeo metilado. (b) Pareamento do RNA com snoRNA da caixa H/ACA para guiar pseudouridilações. Os sítios de conversão da pseudouridina no rRNA-alvo (segmentos verdes) estão novamente nas regiões pareadas com o snoRNA, e as sequências da caixa H/ACA conservada são sítios de ligação de proteínas. [Fonte: informação obtida de T. Kiss, *Cell* 109:145, 2002.]

Os precursores do RNA transportador podem sofrer processamento pós-transcricional adicional. O trinucleotídeo CCA(3') 3'-terminal, ao qual um aminoácido é ligado durante a síntese proteica (Capítulo 27), está ausente de alguns precursores de tRNA bacterianos e de todos os de eucariotos e é adicionado durante o processamento (Figura 26-26). Essa adição é feita pela nucleotidiltransferase do tRNA, uma enzima incomum que liga os três precursores de ribonucleosídeos trifosfato em sítios ativos separados e catalisa a formação de ligações fosfodiéster para

produzir a sequência CCA(3'). A criação dessa sequência definida de nucleotídeos é, portanto, não dependente de um molde de DNA ou RNA – o molde é o sítio de ligação da enzima.

O tipo final de processamento de tRNA é a modificação de algumas bases por metilação, desaminação ou redução (Figura 26-22). No caso da pseudouridina, a base (uracila) é removida e religada ao açúcar por meio do C-5. Algumas dessas bases modificadas ocorrem em posições características em todos os tRNA (Figura 26-26).

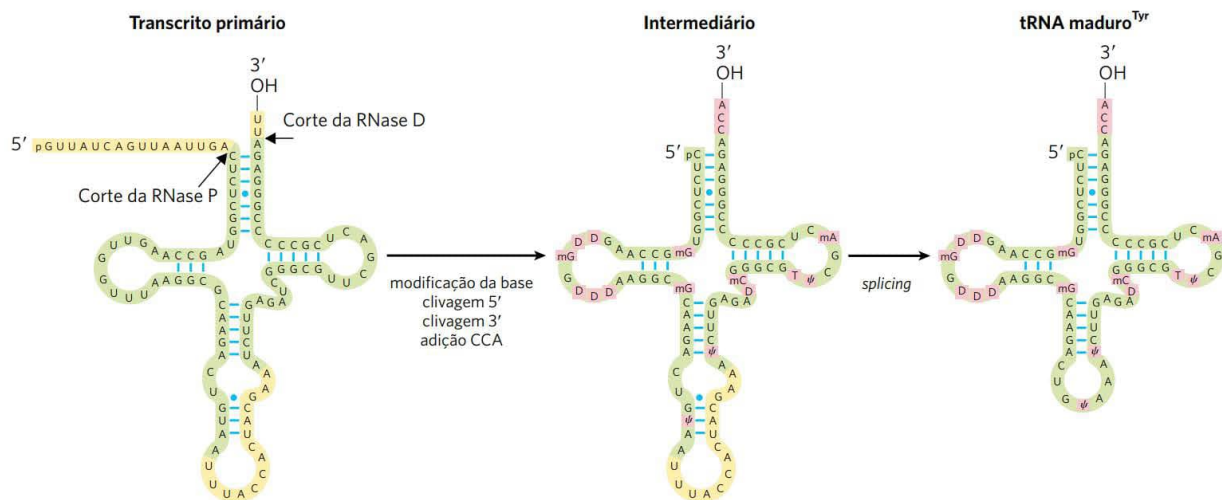


FIGURA 26-26 Processamentos dos tRNA em bactérias e eucariotos. O tRNA^{Tyr} (o tRNA específico para a ligação da tirosina; ver Capítulo 27) de levedura é usado para ilustrar as etapas importantes. Linhas azuis curtas representam pareamento normal de bases; pontos azuis indicam pares de bases G—U. As sequências de nucleotídeos mostradas em amarelo são removidas do transcrito primário. As extremidades são processadas primeiro, a extremidade 5' antes da extremidade 3'. O CCA é, então, adicionado à extremidade 3', etapa necessária no processamento dos tRNA de eucariotos e daqueles tRNA bacterianos que não apresentam essa sequência no transcrito primário. Enquanto as extremidades estão sendo processadas, bases específicas no resto do transcrito são modificadas (ver Figura 26-22). Para o tRNA de eucariotos mostrado aqui, a etapa final é o *splicing* do intron de 14 nucleotídeos. Os introns são encontrados em alguns tRNA de eucariotos, mas não em tRNA bacterianos.

Os RNA com função especial sofrem vários tipos de processamento

O número de classes conhecidas de RNA de função especial está aumentando rapidamente, bem como a variedade de funções associadas a eles. Muitos desses RNA sofrem processamento.

Os snRNA e snoRNA não apenas facilitam as reações de processamento do RNA, mas são eles mesmos sintetizados como precursores maiores e, então, processados. Muitos snoRNA são codificados no interior dos íntrons de outros genes. À medida que os íntrons sofrem *splicing* a partir do pré-mRNA, as proteínas snoRNP se ligam às sequências de snoRNA, e as ribonucleases removem o RNA extra nas extremidades 5' e 3'. Os snRNA destinados aos espliceossomos são sintetizados como pré-snRNA pela RNA-polimerase II, e as ribonucleases removem o RNA extra em cada extremidade. Nucleosídeos específicos nos snRNAs também estão sujeitos a 11 tipos de modificações, com o predomínio da 2'-O-metilação e conversão de uridina em pseudouridina.

Os **microRNA (miRNA)** são uma classe especial de RNA envolvidos na regulação gênica. Eles são RNA não codificadores, com cerca de 22 nucleotídeos de comprimento, complementares das sequências de regiões específicas de mRNA. Encontrados em plantas e animais, de vermes a mamíferos, eles promovem a degradação do mRNA e suprimem a tradução. Cerca de 1.500 genes humanos codificam miRNA, e um ou mais desses miRNA afetam a expressão da maioria dos genes codificadores de proteínas.

Os miRNA são sintetizados a partir de precursores muito maiores, em várias etapas (**Figura 26-27**). Os transcritos primários para miRNA (pri-miRNA) variam muito de tamanho; alguns deles são codificados nos íntrons de outros genes e são coexpressos com esses genes hospedeiros. Seus papéis na regulação gênica são detalhados no Capítulo 28.

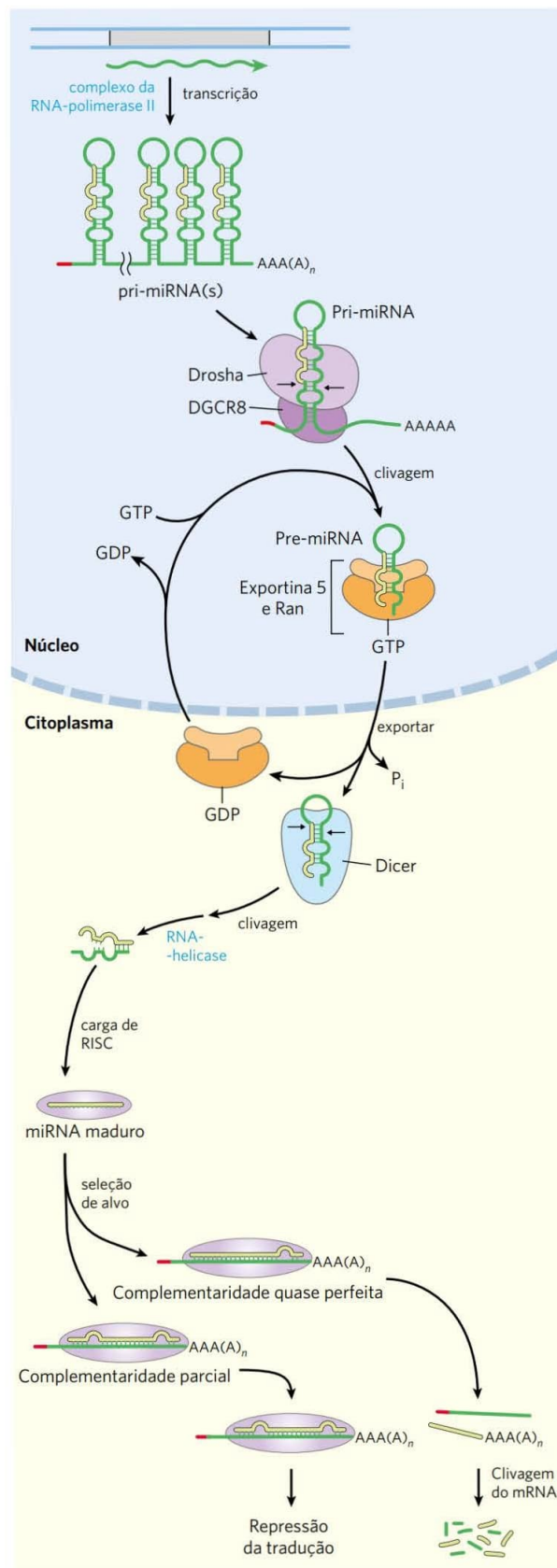


FIGURA 26-27 Síntese e processamento dos miRNA. O transcrito primário de miRNA é um RNA grande e de comprimento variável, denominado pri-miRNA. A maior parte do seu processamento é mediada por duas endorribonucleases na família da RNase III, Drosha e Dicer. Primeiro, no núcleo, o pri-miRNA é reduzido a um precursor miRNA de 70 a 80 nucleotídeos (pré-miRNA) por um complexo proteico que inclui a Drosha e outra proteína, a DGCR8. O pré-miRNA é, então, exportado para o citoplasma em um complexo com duas proteínas, exportina-5 e a Ran GTPase (ver Figura 27-44). No citoplasma, a Ran hidrolisa o GTP e, então, a proteína exportina-5 e o pré-miRNA são liberados. As proteínas Ran-GDP e a exportina-5 são transportadas de volta para o núcleo. O pré-miRNA é acionado pela Dicer para produzir o quase maduro miRNA pareado com um pequeno complemento de RNA. O complemento é removido por uma RNA-helicase, e o miRNA maduro é incorporado em complexos de proteínas, como o complexo de silenciamento induzido pelo RNA (RISC), que, então, liga-se a um mRNA-alvo. Se a complementaridade entre o miRNA e seu alvo é quase totalmente perfeita, o mRNA-alvo é clivado. Se a complementaridade é apenas parcial, o complexo bloqueia a tradução do mRNA-alvo. [Fonte: informação obtida de E. Wienholds e R. H. A. Plasterk, *FEBS Lett.* 579:5911, 2005; V. N. Kim et al., *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 10:126, 2009, Figs. 2-4.]

As enzimas de RNA são os catalisadores de alguns eventos no metabolismo de RNA

O estudo do processamento pós-transcricional de moléculas de RNA levou a uma das descobertas mais excitantes da bioquímica moderna – a existência de enzimas de RNA. As ribozimas mais bem caracterizadas são os íntrons do grupo I que sofrem *autosplicing*, a RNase P e a ribozima cabeça-de-martelo (discutida a seguir). A maior parte das atividades dessas ribozimas se baseia em duas reações fundamentais: transesterificação (Figura 26-13) e hidrólise da ligação fosfodiéster (clivagem). O substrato para as ribozimas é frequentemente uma molécula de RNA, e pode até mesmo ser parte da própria ribozima. Quando o seu substrato é o RNA, o catalisador de RNA pode fazer uso de interações de pares de bases para alinhar o substrato para a reação.

As ribozimas variam muito de tamanho. Um íntron do grupo I que sofre *autosplicing* pode ter mais de 400 nucleotídeos. A ribozima cabeça-de-martelo consiste em duas fitas de RNA com apenas 41 nucleotídeos no total (Figura 26-28). Como nas enzimas proteicas, a estrutura tridimensional das ribozimas é importante para o seu funcionamento. As ribozimas são inativadas pelo calor acima da sua temperatura de fusão ou pela adição de agentes desnaturadores ou de oligonucleotídeos complementares, que quebram os padrões normais de pareamento de bases. As ribozimas também podem ser inativadas se nucleotídeos essenciais forem alterados. A estrutura secundária de um íntron do grupo I que sofre *autosplicing* a partir do precursor do rRNA 26S da *Tetrahymena* está mostrado em detalhes na Figura 26-29.

Propriedades enzimáticas dos íntrons do grupo I Os íntrons do grupo I de *autosplicing* compartilham várias propriedades com enzimas, além de acelerar a velocidade da reação, incluindo o comportamento cinético e a especificidade. A ligação do cofator da guanosina (Figura 26-13) ao íntron do grupo I do rRNA da *Tetrahymena* é saturável ($K_m < 30 \mu\text{M}$) e pode ser inibida competitivamente pela 3'-desoxiguanosina. O íntron é muito preciso na sua reação de excisão, em grande parte devido a um segmento chamado de **sequência-guia interna**, que pode se parear com sequências de éxons próximas do sítio de *splice* 5' (Figura 26-29). Esse pareamento promove o alinhamento de ligações específicas a serem clivadas e religadas.

Como o próprio íntron é quimicamente alterado durante a reação de *splicing* – suas extremidades são clivadas – ele parece não ter uma propriedade enzimática essencial: a capacidade de catalisar reações múltiplas. Uma observação mais detalhada demonstrou que, após a excisão, o íntron de 414 nucleotídeos do rRNA da *Tetrahymena* pode, *in vitro*, atuar como uma verdadeira enzima (mas, *in vivo*, ele é rapidamente degradado). Uma série de ciclizações intramoleculares e reações de clivagem no íntron removido leva à perda de 19 nucleotídeos de sua extremidade 5'. O RNA linear remanescente de 395 nucleotídeos – chamado de L-19 IVS (sequência interveniente) – promove reações de transferência de nucleotidila, nas quais alguns oligonucleotídeos são alongados à custa de outros (Figura 26-30). Os melhores substratos são oligonucleotídeos, como um oligômero (C)₅ sintético, que pode se parear com a mesma

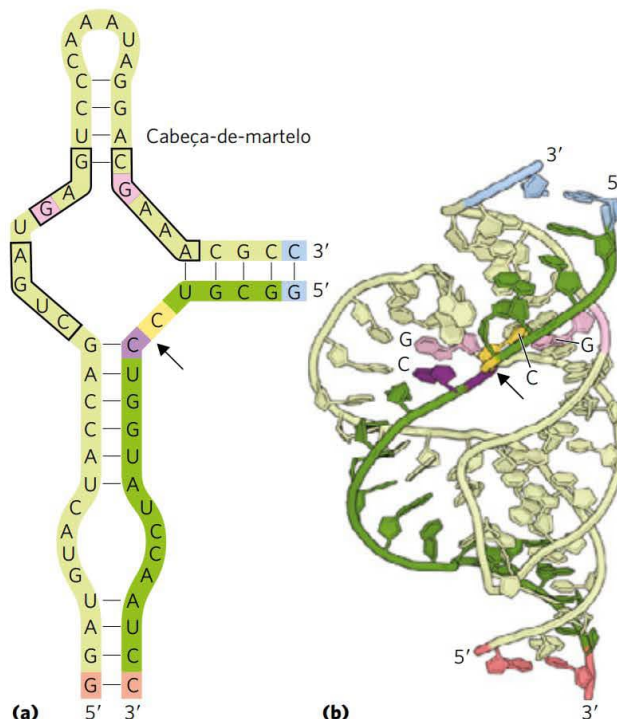


FIGURA 26-28 Ribozima cabeça-de-martelo. Certos elementos semelhantes a vírus, ou virusóides, têm pequenos genomas de RNA e geralmente precisam de outro vírus para auxiliar na sua replicação ou no acondicionamento, ou em ambos. Alguns RNA virusóides incluem pequenos segmentos que promovem reações de clivagem de RNA específicos de sítios associados à replicação. Esses segmentos são chamados de ribozimas cabeça-de-martelo, pois suas estruturas secundárias têm a forma da cabeça de um martelo. Essas ribozimas foram identificadas e estudadas separadamente a partir de RNA virais bem maiores. **(a)** Sequências mínimas necessárias para a catálise pela ribozima. Os nucleotídeos dentro das caixas são altamente conservados e são necessários para a função catalítica. Os nucleotídeos de guanina sombreados em cor-de-rosa fazem parte do sítio ativo. A seta indica o sítio de autoclivagem. **(b)** Estrutura tridimensional (ver Figura 8-25b para uma visão de volume atômico de uma outra ribozima cabeça-de-martelo). As fitas são coloridas como em (a). A ribozima cabeça-de-martelo é uma metaloenzima; íons Mg^{2+} são necessários para a atividade *in vivo*. A ligação fosfodiéster no sítio de autoclivagem é indicada por uma seta. [Fonte: (b) PDB ID 3ZD5, M. Martick e W. G. Scott, *Cell* 126:309, 2006.]

sequência-guia interna rica em guanilato, a qual mantém o éxon 5' no lugar para *autosplicing*.

A atividade enzimática da ribozima L-19 IVS resulta de um ciclo de reações de transesterificação mecanicamente semelhantes ao *autosplicing*. Cada molécula de ribozima pode processar cerca de 100 moléculas de substrato por hora sem ser alterada na reação; portanto, o íntron atua como um catalisador. Ele segue a cinética de Michaelis-Menten, é específico para os substratos de oligonucleotídeos do RNA e pode ser inibido competitivamente. A k_{cat}/K_m (constante de especificidade) é de $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, mais baixa do que muitas enzimas, mas a ribozima acelera a hidrólise por um fator de 10^{10} em relação à reação não catalisada. Ela faz uso das estratégias de orientação do substrato, catálise co-

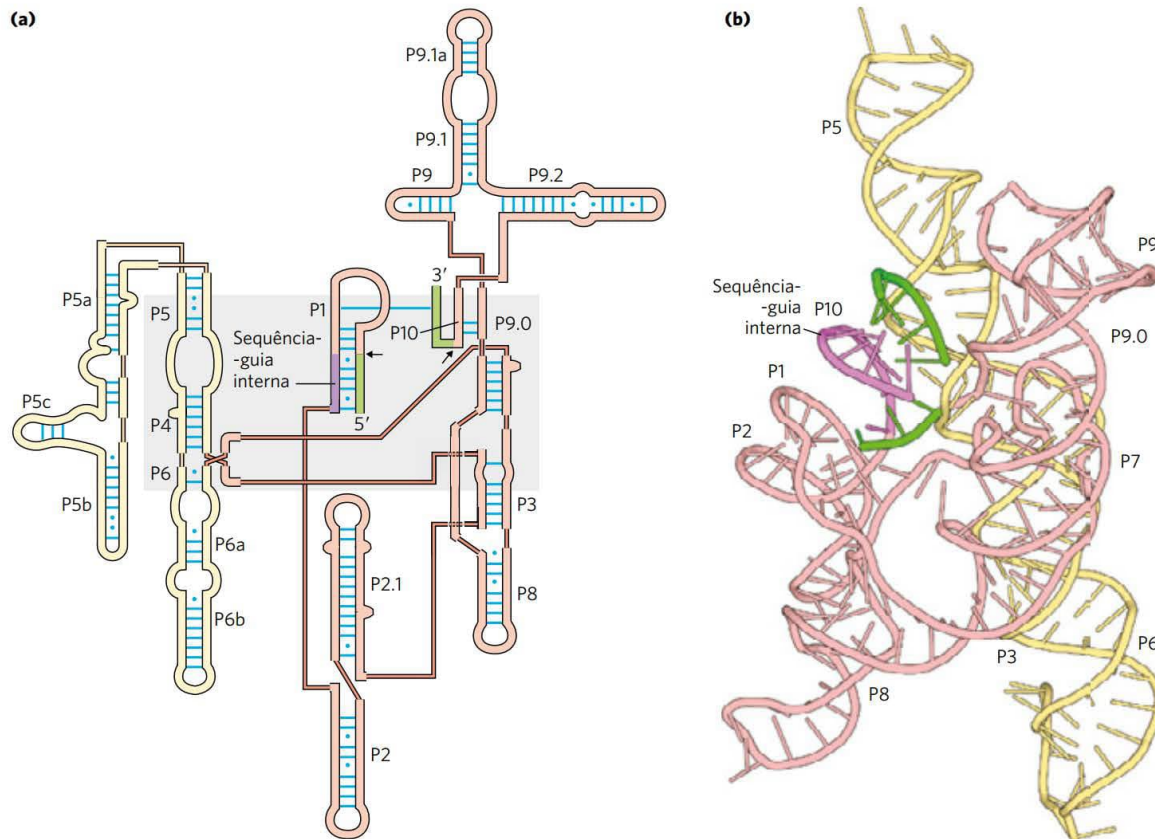


FIGURA 26-29 Estrutura secundária do íntron de rRNA que sofre *autosplicing* de *Tetrahymena*. (a) Uma representação bidimensional da estrutura secundária imediatamente antes do início da reação. As seqüências de íntrons estão sombreadas em amarelo e vermelho-claro; seqüências flanqueadoras do éxon estão em verde; as seqüências-guia internas que ajudam a alinhar os segmentos reagentes no sítio ativo estão em roxo. Cada linha fina em cor salmão representa uma ligação entre nucleotídeos vizinhos em uma seqüência contínua (dispositivo necessário para mostrar essa molécula complexa em duas dimensões). Linhas azuis curtas representam pareamento normal de bases; pontos azuis indicam pares de bases G—U. Todos os nucleotídeos estão mostrados. O núcleo catalítico da atividade de *autosplicing* está sombreado em cinza. Algumas regiões de pareamento de bases estão marcadas (P1, P3, P2.1, P5a, e assim por diante) de acordo com uma convenção estabelecida para essa molécula de RNA. A região P1, que contém a seqüência-guia interna (em roxo), é a localização do sítio de *splicing* 5' (seta preta). Parte da seqüência-guia interna estabelece pareamento com a extremidade 3' do éxon, colocando os sítios de *splicing* 5' e 3' (setas pretas) em proximidade estreita. (b) Estrutura tridimensional de um intermediário de reação do mesmo íntron, após a clivagem mediada por guanosina (Figura 26-14) e antes da ligação do éxon. Os segmentos estão coloridos como em (a). [Fontes: (a) PDB ID 1GID, J. H. Cate et al., *Science* 273:1678, 1996. (b) PDB ID 1U6B, P. L. Adams et al., *Nature* 430:45, 2004.]

valente e catálise do íon metálico, todas empregadas pelas proteínas enzimáticas.

Características de outras ribozimas A RNase P da *E. coli* tem tanto um componente de RNA (o M1 RNA, com 377 nucleotídeos) quanto um componente proteico (M_r 17.500). Em 1983, Sidney Altman e Norman Pace e colaboradores descobriram que, sob determinadas condições, o M1 RNA sozinho é capaz de catálise, clivando os precursores de tRNA na posição correta. O componente proteico aparentemente serve para estabilizar o RNA ou facilitar sua função *in vivo*. A ribozima RNase P reconhece a forma tridimensional do seu substrato pré-tRNA, junto com a seqüência CCA, e, portanto, pode clivar as seqüências-líder 5' de diversos tRNA (Figura 26-26).

O repertório de ribozimas catalíticas conhecidas continua a se expandir. Alguns virusóides, pequenos RNA associados a vírus de RNA de plantas, incluem a estrutura que

promove uma reação de autoclivagem; a ribozima cabeça-de-martelo, ilustrada na Figura 26-28, está nessa classe, catalisando a hidrólise de uma ligação fosfodiéster interna. Existem pelo menos nove classes estruturais de ribozimas que se envolvem em autoclivagem; todas usam catálise geral acidobásica (Figura 6-8) para promover o ataque de um grupo 2'-hidroxila em uma ligação fosfodiéster adjacente. A reação de *splicing* que ocorre em um espliceossomo parece depender de um centro catalítico formado pelos snRNA U2, U5 e U6 (Figura 26-16). E, como veremos no Capítulo 27, um componente de RNA dos ribossomos catalisa a síntese proteica.

A investigação dos RNA catalíticos forneceu novos entendimentos sobre a função catalítica em geral e tem implicações importantes para nossa compreensão sobre a origem e a evolução da vida neste planeta, tópico discutido na Seção 26.3.

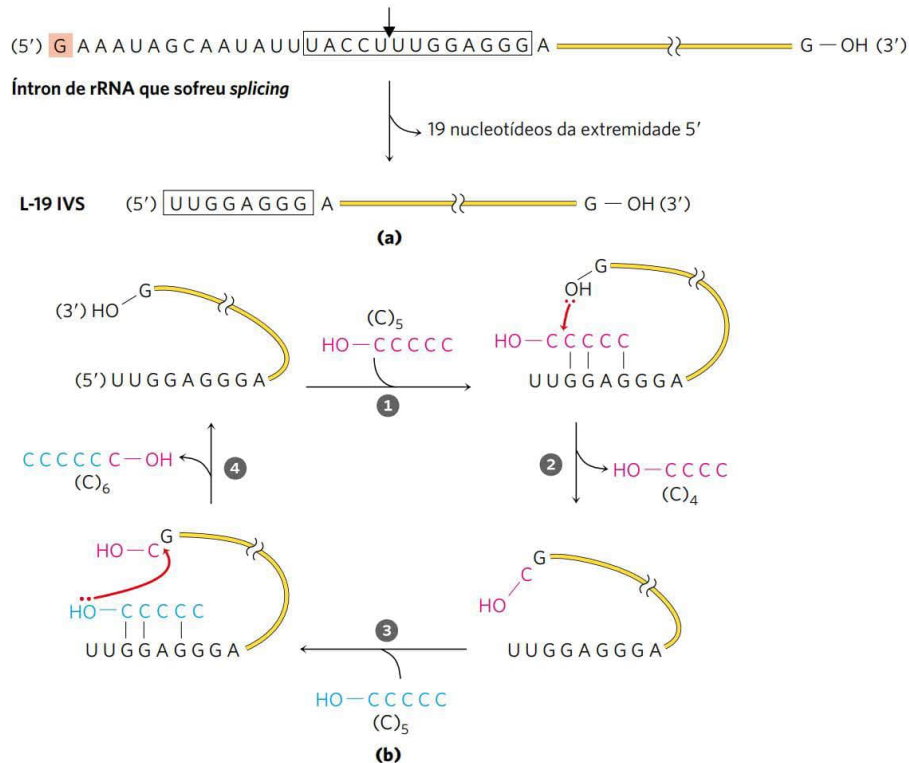


FIGURA 26-30 Atividade catalítica *in vitro* da L-19 IVS. (a) A L-19 IVS é gerada pela remoção autocatalítica de 19 nucleotídeos da extremidade 5' do íntron de *Tetrahymena* que passa por *splicing*. O sítio de clivagem é indicado pela seta na sequência-guia interna (dentro da caixa). O resíduo G (sombreado em cor salmão) adicionado na primeira etapa da reação de *splicing* (ver Figura 26-14) é parte da sequência removida. Uma porção da sequência-guia interna permanece na extremidade 5' da L-19 IVS. (b) A L-19 IVS alonga alguns oligonucleotídeos de RNA às custas de outros em um ciclo de reações de transesterificação (etapas 1 a 4). A 3'-OH do resíduo G na extremidade 3' da L-19 IVS desempenha um papel importante neste ciclo (observe que este não é o resíduo G adicionado na reação de *splicing*). O (C)₅ é um dos melhores substratos da ribozima, uma vez que ele pode parear suas bases com a sequência-guia restante no íntron. Embora esta atividade catalítica seja provavelmente irrelevante para a célula, ela tem importantes aplicações para hipóteses atuais sobre evolução, discutidas ao final deste capítulo.

Os mRNA celulares são degradados em taxas diferentes

A expressão dos genes é regulada em vários níveis. Um fator crucial governando a expressão de um gene é a concentração celular do seu mRNA associado. A concentração de qualquer molécula depende de dois fatores: sua velocidade de síntese e sua velocidade de degradação. Quando a síntese e a degradação de um mRNA estão equilibradas, a concentração do mRNA permanece em um estado estacionário. Uma mudança em qualquer das velocidades resultará em um acúmulo ou esgotamento do mRNA. Vias de degradação garantem que os mRNA não se acumulem na célula, dirigindo a síntese de proteínas desnecessárias.

As velocidades de degradação variam muito para mRNA nos diferentes genes de eucariotos. Para um produto de um gene que é necessário apenas temporariamente, a meia-vida do seu mRNA pode ser de apenas minutos, ou mesmo segundos. Os produtos gênicos necessários constantemente pela célula podem ter mRNA que são estáveis por várias gerações celulares. A meia-vida média dos mRNA de uma célula de vertebrado é de cerca de 3 horas, com o conjunto de cada tipo de mRNA sendo repostado cerca de 10 vezes por

geração celular. A meia-vida dos mRNA bacterianos é muito menor – apenas cerca de 1,5 minutos –, talvez devido às necessidades de regulação.

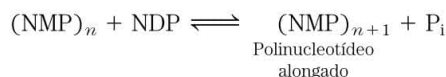
O RNA mensageiro é degradado pelas ribonucleases presentes em todas as células. Em *E. coli*, o processo começa com um ou vários cortes por uma endorribonuclease, seguido por degradação 3'→5' por exorribonucleases. Em eucariotos inferiores, a via principal envolve primeiro o encurtamento da cauda poli(A), e, em seguida, a remoção do cap da extremidade 5' e a degradação do mRNA na direção 5'→3'. A via degradativa 3'→5' também existe, e pode ser a via principal em eucariotos superiores. Todos os eucariotos apresentam um complexo de até 10 exorribonucleases 3'→5' conservadas, denominado **exossomo**, que está envolvido no processamento da extremidade 3' dos rRNA, tRNA e alguns RNA de função especial (incluindo snRNA e snoRNA), bem como na degradação de mRNA.

Uma estrutura em grampo nos mRNA bacterianos, com um terminador independente de ρ (Figura 26-7), confere estabilidade contra a degradação. Estruturas semelhantes a grampios podem tornar mais estáveis algumas partes de um transcrito primário, levando à degradação não uniforme dos

transcritos. Em células de eucariotos, tanto a cauda poli(A) 3' quanto o 5' cap são importantes para a estabilidade de vários mRNA.

A polinucleotídeo-fosforilase produz polímeros aleatórios semelhantes ao RNA

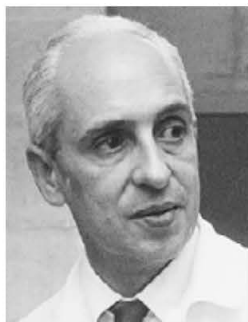
Em 1955, Marianne Grunberg-Manago e Severo Ochoa descobriram a enzima bacteriana **polinucleotídeo-fosforilase**, que catalisa *in vitro* a reação



A polinucleotídeo-fosforilase foi a primeira enzima sintetizadora de ácidos nucleicos descoberta (a descoberta da DNA-polimerase por Arthur Kornberg ocorreu logo em seguida). A reação catalisada pela polinucleotídeo-fosforilase é fundamentalmente diferente das atividades da polimerase discutidas até agora pelo fato de não ser dependente de molde. A enzima usa 5'-difosfatos de ribonucleosídeos como substratos e não pode atuar nos homólogos 5'-trifosfatos ou nos desoxirribonucleosídeos 5'-difosfatos. O polímero de RNA formado pela polinucleotídeo-fosforilase contém as ligações usuais 3',5'-fosfodiéster, que podem ser hidrolisadas pela ribonuclease. A reação é prontamente reversível e pode ser empurrada na direção da quebra do polirribonucleotídeo aumentando-se a concentração de fosfato. A provável função dessa enzima na célula é a degradação dos mRNA a nucleosídeos difosfatos.



Marianne Grunberg-Manago,
1921-2013
[Fonte: Philippe Eranian/
Sygma/Corbis.]



Severo Ochoa, 1905-1993
[Fonte: AP Images.]

Como a reação de polinucleotídeo-fosforilase não usa um molde, o polímero que ela forma não tem uma sequência de bases específica. A reação ocorre igualmente bem com qualquer um, ou todos, dos quatro nucleosídeos difosfatos, e a composição de bases do polímero resultante reflete nada mais do que as concentrações relativas dos substratos 5'-difosfato no meio.

A polinucleotídeo-fosforilase pode ser usada em laboratório para preparar polímeros de RNA com muitas sequências de base e frequências diferentes. O uso de polímeros de RNA sintético desse tipo foi fundamental para deduzir o código genético dos aminoácidos (Capítulo 27).

RESUMO 26.2 Processamento de RNA

- Os mRNA de eucariotos são modificados pela adição de um resíduo de 7-metilguanosina na extremidade 5' e pela clivagem e poliadenilação na extremidade 3' para formar uma longa cauda poli(A).
- Muitos transcritos primários de mRNA contêm íntrons (regiões não codificadoras), que são removidos por *splicing*. A remoção dos íntrons do grupo I encontrada em alguns rRNA precisa de um cofator de guanosina. Alguns íntrons dos grupos I e II são capazes de *autosplicing*; nenhuma proteína enzimática é necessária. Os precursores de mRNA nuclear têm uma terceira (a maior) classe de íntrons, que são unidos com o auxílio de complexos RNA-proteína, chamados de snRNP, os quais são montados em espliceossomos. Uma quarta classe de íntrons, encontrada em alguns tRNA, consiste nos únicos íntrons que se sabe que sofrem *splicing* por proteínas enzimáticas.
- A função de muitos mRNA de eucariotos é regulada por microRNA (miRNAs). Os miRNA são, em si, derivados de precursores maiores por meio de uma série de reações de processamento.
- Os RNAs ribossômicos e os RNA transportadores são derivados de precursores de RNA longos, clivados por nucleases. Algumas bases são modificadas enzimaticamente durante o processo de maturação. Algumas modificações de nucleosídeos são guiadas por snoRNA, com complexos de proteínas chamados de snoRNP.
- Os íntrons que sofrem *autosplicing* e o componente de RNA da RNase P (que cliva a extremidade 5' dos precursores de tRNA) são dois exemplos de ribozimas. Esses catalisadores biológicos têm as propriedades de enzimas verdadeiras. Eles geralmente promovem a clivagem hidrolítica e a transesterificação, usando o RNA como substrato. Combinações dessas reações podem ser promovidas pelo íntron do grupo I retirado do rRNA da *Tetrahymena*, resultando em um tipo de reação de polimerização do RNA.
- A polinucleotídeo-fosforilase forma, de modo reversível, polímeros semelhantes ao RNA a partir de ribonucleosídeos 5'-difosfato, adicionando ou removendo ribonucleotídeos na extremidade 3'-hidroxila do polímero. A enzima degrada RNA *in vivo*.

26.3 Síntese de RNA dependente de RNA e síntese de DNA dependente de RNA

Em nossa discussão sobre a síntese de DNA e RNA até agora, o papel da fita-molde foi reservado ao DNA. Entretanto, algumas enzimas usam um molde de RNA para a síntese de ácido nucleico. Com a exceção muito importante dos vírus com um genoma de RNA, essas enzimas desempenham apenas um modesto papel nas vias de informação. Os vírus de RNA são a fonte da maioria das polimerases dependentes de RNA caracterizadas até agora.

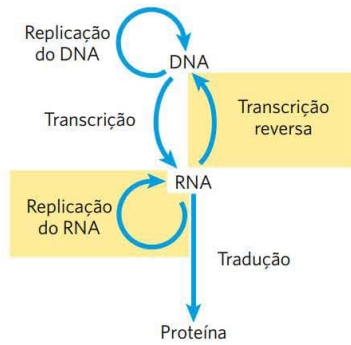


FIGURA 26-31 Ampliação do dogma central para incluir a síntese de RNA dependente de RNA e a síntese de DNA dependente de RNA.

A existência da replicação do RNA precisa de uma elaboração do dogma central (**Figura 26-31**; comparar essa figura com o diagrama na p. 955). As enzimas do processo de replicação do RNA têm implicações profundas nas investigações sobre a natureza das moléculas autorreplicantes que podem ter existido em tempos prebióticos.

A transcriptase reversa produz DNA a partir de RNA viral

Certos vírus de RNA que infectam as células animais transportam no interior da partícula viral uma DNA-poli-merase dependente de RNA, chamada de **transcriptase reversa**. Na infecção, o genoma viral de fita simples de RNA (~10.000 nucleotídeos) e a enzima entram na célula hospedeira. Primeiro, a transcriptase reversa catalisa a síntese de uma fita de DNA complementar ao RNA viral (**Figura 26-32**), então degrada a fita de RNA do híbrido de RNA-DNA viral e o substitui por DNA. O duplex de DNA resultante frequentemente fica incorporado ao genoma da

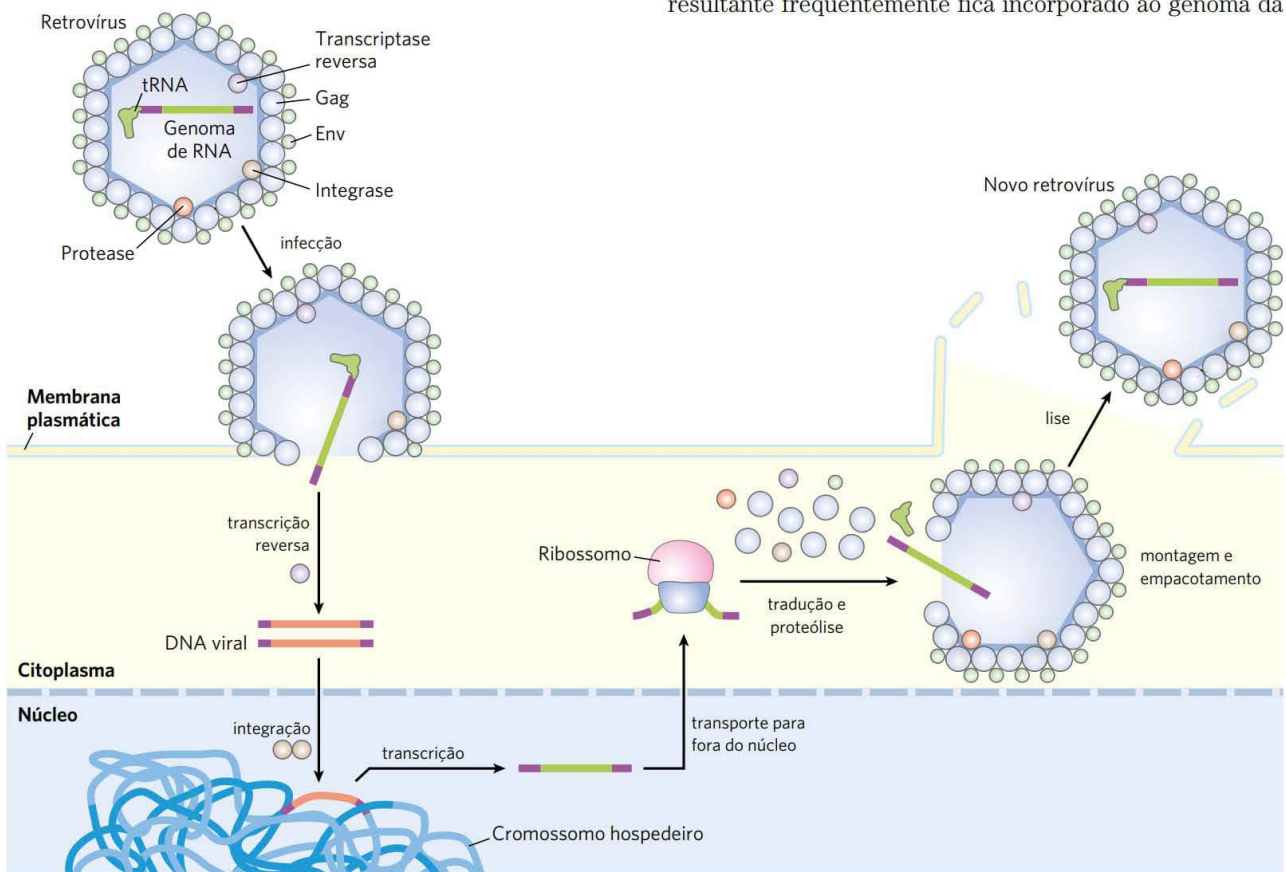


FIGURA 26-32 Infecção retroviral de uma célula de mamífero e integração do retrovírus no cromossomo do hospedeiro. Partículas virais que entram na célula hospedeira carregam a transcriptase reversa viral e um tRNA celular (captado de uma célula hospedeira anterior) já pareado ao RNA viral. Os segmentos roxos representam as longas repetições terminais no RNA viral. O tRNA facilita a conversão imediata do RNA viral a DNA de dupla-fita pela ação da transcriptase reversa, como descrito no texto. O DNA de dupla-fita entra no núcleo e é integrado ao genoma do hospedeiro. A integração é catalisada por uma integrase codificada pelo vírus. A integração do DNA viral no DNA do hospedeiro é semelhante mecanicamente à inserção de transposons em cromossomos bacterianos (ver Figura 25-42). Por exemplo, alguns poucos pares de bases do DNA do hospedeiro se tornam duplicados no sítio de integração, formando repetições curtas de 4 a 6 pares de bases em cada extremidade do DNA retroviral inserido (não mostrado). Na transcrição e na tradução do DNA viral integrado, novos vírus são formados e liberados pela lise celular (à direita). Nos vírus, o RNA viral é envolvido por proteínas do capsídeo, chamadas de Gag, e por proteínas do envoltório externo, chamadas de Env. Proteínas virais adicionais (transcriptase reversa, integrase e uma protease viral necessária para o processamento pós-tradução das proteínas virais) são acondicionadas no interior de uma partícula de vírus com o RNA.

célula hospedeira eucariótica. Esses genes virais integrados (e dormentes) podem ser ativados e transcritos, e os produtos gênicos – proteínas virais e o próprio genoma de RNA –, acondicionados como novos vírus. Os vírus de RNA que contêm transcriptases reversas são conhecidos como **retrovírus** (*retro* é o prefixo latino para “para trás”).

A existência de transcriptases reversas em vírus de RNA foi prevista por Howard Temin, em 1962, e as enzimas foram, em última análise, detectadas por Temin e, independentemente, por David Baltimore, em 1970. Essa descoberta atraiu muita atenção como uma prova de que a informação genética pode fluir “para trás”, do RNA para o DNA, abalando o dogma da passagem da informação apenas do DNA para o RNA.



Howard Temin, 1934-1994
[Fonte: Corbis/UPI/Bettmann.]



David Baltimore
[Fonte: AP Photo.]

Os retrovírus têm geralmente três genes: *gag* (um nome derivado da designação histórica antígeno associado ao grupo [do inglês, *group associated antigen*]), *pol* e *env* (Figura 26-33). O transcrito que contém *gag* e *pol* é traduzido em uma longa “poliproteína”, único grande polipeptídeo clivado em seis proteínas com funções distintas. As proteínas derivadas do gene *gag* constituem o núcleo interno da partícula viral. O gene *pol* codifica a protease que cliva o longo polipeptídeo, uma integrase que insere o DNA viral nos cromossomos do hospedeiro e a transcriptase reversa. Muitas transcriptases reversas têm duas subunidades, α e β . O gene *pol* especifica a subunidade β (M_r 90.000), e a subunidade α (M_r 65.000) é simplesmente um fragmento proteolítico da subunidade β . O gene *env* codifica as proteínas do envelope viral. Em cada extremidade do genoma de RNA linear encontram-se longas sequências de repetições terminais (LTR) de algumas centenas de nucleotídeos. Transcritas no DNA duplex, essas sequências facilitam a integração do cromossomo viral no DNA do hospedeiro e contêm promotores para a expressão do gene viral.

As transcriptases reversas catalisam três reações diferentes: (1) síntese de DNA dependente de RNA, (2) degradação de RNA e (3) síntese de DNA dependente de DNA. Como muitas DNA-polimerases e RNA-polimerases, as transcriptases reversas contêm Zn^{2+} . Cada transcriptase é mais ativa com o RNA do seu próprio vírus, mas cada uma pode ser usada experimentalmente para construir DNA complementar a uma variedade de RNA. As atividades de síntese de DNA e RNA e a degradação do RNA empregam sítios ativos separados na proteína. Para que a síntese de

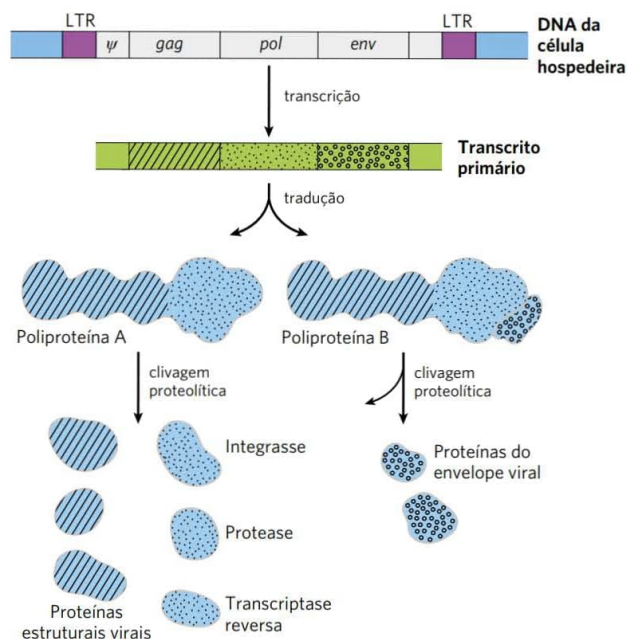


FIGURA 26-33 Estrutura e produtos gênicos de um genoma retroviral integrado. Repetições terminais longas (LTR) têm sequências necessárias para a regulação e a iniciação da transcrição. A sequência denominada ψ é necessária para o acondicionamento dos RNA retrovirais em partículas virais maduras. A transcrição do DNA retroviral produz um transcrito primário que abrange os genes *gag*, *pol* e *env*. A tradução (Capítulo 27) produz uma poliproteína, um único polipeptídeo longo derivado dos genes *gag* e *pol*, que é clivada em seis proteínas distintas. O *splicing* do transcrito primário produz um mRNA derivado, em grande parte, do gene *env*, que também é traduzido em uma poliproteína, clivada então para gerar proteínas virais do envelope.

DNA se inicie, a transcriptase reversa precisa de um oligonucleotídeo iniciador, um tRNA celular obtido durante uma infecção anterior e transportado na partícula viral. Esse tRNA faz pareamento com sua extremidade 3' com uma sequência complementar do RNA viral. A nova fita de DNA é sintetizada na direção 5'→3', como em todas as reações das RNA-polimerases e DNA-polimerases. As transcriptases reversas, como RNA-polimerases, não têm exonucleases revisoras 3'→5'. Elas geralmente têm taxas de erro de cerca de 1 por 20 mil nucleotídeos adicionados. Uma taxa de erro tão alta quanto essa é extremamente incomum na replicação de DNA e parece ser uma característica da maioria das enzimas que replicam os genomas de vírus de RNA. Uma consequência é uma taxa de mutação maior e uma velocidade mais rápida na evolução viral, fator responsável pelo frequente aparecimento de novas linhagens de retrovírus causadores de doenças.

As transcriptases reversas tornaram-se importantes reagentes no estudo das relações DNA-RNA e nas técnicas de clonagem do DNA. Elas tornam possível a síntese de DNA complementar a um molde de mRNA, e o DNA sintetizado preparado dessa maneira, chamado de **DNA complementar (cDNA)**, pode ser usado para clonar genes celulares (ver Figura 9-14).



FIGURA 26-34 Genoma do vírus do sarcoma de Rous. O gene *src* codifica uma tirosina-cinase pertencente a uma classe de enzimas que funciona em sistemas que afetam a divisão celular, as interações célula a célula e a comunicação intercelular (Capítulo 12). O mesmo gene é encontrado no DNA de galinhas (o hospedeiro comum para esse vírus) e nos genomas de muitos outros eucariotos, incluindo os seres humanos. Quando associado ao vírus do sarcoma de Rous, esse oncogene é frequentemente expresso em níveis anormalmente altos, contribuindo para a divisão celular descontrolada e o câncer.

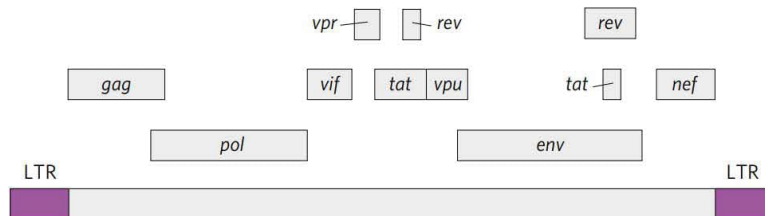


FIGURA 26-35 O genoma do HIV, o vírus que causa a Aids. Além dos genes retrovirais típicos, o HIV contém vários pequenos genes com diversas funções (não identificadas aqui e nem todas conhecidas). Alguns desses genes se sobrepõem. Mecanismos de *splicing* alternativos produzem muitas proteínas diferentes a partir desse pequeno genoma ($9,7 \times 10^3$ nucleotídeos).

Alguns retrovírus causam câncer e Aids



Os retrovírus têm tido destaque em avanços recentes na compreensão molecular do câncer. A maioria dos retrovírus não mata suas células hospedeiras, mas permanece integrada ao DNA celular, replicando quando a célula se divide. Alguns retrovírus, classificados como vírus RNA-tumorais, contêm um oncogene que pode levar a célula a crescer anormalmente. O primeiro retrovírus desse tipo a ser estudado foi o vírus do sarcoma de Rous (também chamado de vírus do sarcoma aviário; **Figura 26-34**), denominado em homenagem a F. Peyton Rous, que estudou tumores de galinhas que, sabe-se agora, foram causados por esse vírus. Desde a descoberta inicial dos oncogenes por Harold Varmus e Michael Bishop, muitas dúzias de genes como esses foram encontrados em retrovírus.

O vírus da imunodeficiência humana (HIV), que causa a síndrome da imunodeficiência adquirida (Aids), é um retrovírus. Identificado em 1983, o HIV tem um genoma de RNA com genes retrovirais padrão junto com vários outros genes incomuns (**Figura 26-35**). Ao contrário de vários outros vírus, o HIV mata muitas das células que ele infecta (principalmente linfócitos T), em vez de provocar a formação de tumores. Isso leva gradualmente à supressão do sistema imune no hospedeiro. A transcriptase reversa do HIV é ainda mais propensa a erros do que outras transcriptases reversas conhecidas – 10 vezes mais –, resultando em altas taxas de mutação nesse vírus. Um ou mais erros ocorrem geralmente a cada vez que o genoma viral é replicado, e duas moléculas virais quaisquer provavelmente são diferentes.

Muitas vacinas modernas para infecções virais consistem em uma ou mais proteínas de revestimento do vírus, produzidas pelos métodos descritos no Capítulo 9. Essas proteínas não são infecciosas, porém estimulam o sistema imune a reconhecer e resistir a invasões virais subsequentes (Capítulo 5). Devido à alta taxa de erro da transcriptase reversa do HIV, o gene *env* nesse vírus (junto com o resto do genoma) sofre mutação muito rápida, dificultando

o desenvolvimento de uma vacina efetiva. Entretanto, são necessários ciclos repetidos de invasão celular e replicação para propagar uma infecção de HIV, de modo que a inibição de enzimas virais oferece a terapia mais eficiente disponível atualmente. A protease do HIV é o alvo de uma classe de fármacos, chamada de inibidores de protease (ver Figura 6-25). A transcriptase reversa é o alvo de alguns fármacos adicionais amplamente usados para tratar indivíduos infectados pelo HIV (Quadro 26-2). ■

Muitos transposons, retrovírus e introns podem ter origem evolutiva comum

Alguns transposons bem conhecidos de DNA de eucariotos de fontes tão diversas quanto leveduras e mosca-das-frutas têm uma estrutura muito semelhante àquela dos retrovírus; eles são, às vezes, chamados de retrotransposons (**Figura 26-36**). Eles codificam uma enzima homóloga à transcriptase reversa retroviral, e suas regiões codificadoras são ladeadas por sequências LTR. Eles se transpõem de uma posição para outra no genoma celular por meio de um intermediário de RNA, usando a transcriptase reversa para fazer uma cópia de DNA do RNA, seguida da integração do DNA ao novo local. A maioria dos transposons em eucario-

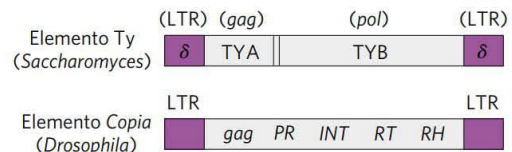


FIGURA 26-36 Transposons de eucariotos. O elemento Ty da levedura *Saccharomyces* e o elemento copia da mosca-das-frutas *Drosophila* servem como exemplos de retrotransposons de eucariotos, que, com frequência, têm uma estrutura semelhante à dos retrovírus, mas não têm o gene *env*. As sequências δ do elemento Ty são funcionalmente equivalentes às LTR retrovirais. No elemento copia, *INT* e *RT* são homólogos aos segmentos da integrase e da transcriptase reversa, respectivamente, do gene *pol*.

QUADRO 26-2

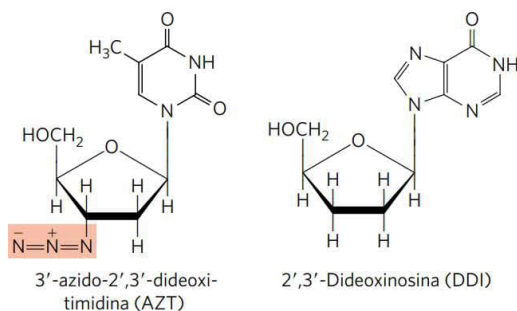


MEDICINA

Combatendo a Aids com inibidores da transcriptase reversa do HIV

Pesquisas sobre a química da biossíntese de ácidos nucleicos dependentes de molde combinadas a técnicas modernas de biologia molecular elucidaram o ciclo de vida e a estrutura do vírus da imunodeficiência humana, o retrovírus que causa a Aids. Poucos anos após o isolamento do HIV, essa pesquisa resultou no desenvolvimento de fármacos capazes de prolongar as vidas de pessoas infectadas pelo HIV.

O primeiro fármaco aprovado para uso clínico foi o AZT, análogo estrutural da desoxitimidina. O AZT foi sintetizado pela primeira vez, em 1964, por Jerome P. Horwitz. Ele fracassou como fármaco anticâncer (o propósito para o qual foi fabricado), porém, em 1985, foi descoberta a sua eficácia no tratamento da Aids. O AZT é captado pelos linfócitos T, células do sistema imune particularmente vulneráveis à infecção pelo HIV, e convertido em trifosfato de AZT (o consumo direto de trifosfato de AZT seria ineficaz, pois ele não consegue atravessar a membrana plasmática).



A transcriptase reversa do HIV tem uma afinidade maior pelo trifosfato de AZT do que por dTTP, e a ligação de trifosfato de AZT a essa enzima inibe competitivamente a ligação ao dTTP. Quando o AZT é adicionado à extremidade 3' da fita de DNA em crescimento, a ausência de uma hidroxila 3' significa que a fita de DNA é terminada prematuramente e que a síntese do DNA viral sofre uma parada.

O trifosfato de AZT não é igualmente tóxico para os próprios linfócitos T, uma vez que as DNA-polimerases celulares têm uma afinidade menor por esse composto do que pelo dTTP. Em concentrações de 1 a 5 μM , o AZT afeta a transcrição reversa, mas não a maior parte da replicação do DNA celular. Infelizmente, o AZT parece ser tóxico para as células da medula óssea que são as progenitoras dos eritrócitos, e muitos indivíduos tomando AZT desenvolvem anemia. O AZT pode aumentar o tempo de sobrevivência de pessoas com Aids avançada em cerca de um ano, e retarda a implantação da Aids naqueles que ainda estão nos estágios iniciais da infecção pelo HIV. Alguns outros compostos para Aids, como a didesóxi-inosina (DDI), têm um mecanismo de ação semelhante. Novos fármacos têm como alvo e inativam a protease do HIV. Devido à alta taxa de erro da transcriptase reversa do HIV e à rápida evolução resultante desse vírus, os tratamentos mais eficazes da infecção pelo HIV usam uma combinação de compostos direcionada tanto para a protease quanto para a transcriptase reversa.

tos usa esse mecanismo para transposição, distinguindo-os dos transposons bacterianos, que se movem como DNA diretamente de uma localização para outra no cromossomo (ver Figura 25-42).

Os retrotransposons não têm um gene *env* e, portanto, não podem formar partículas virais. Eles podem ser considerados vírus defeituosos, capturados pelas células. Comparações entre retrovírus e transposons de eucariotos sugerem que a transcriptase reversa seja uma enzima antiga, anterior à evolução de organismos multicelulares.

Muitos íntrons dos grupos I e II são também elementos genéticos móveis. Além de suas atividades de *autosplicing*, eles codificam endonucleases de DNA que promovem o seu movimento. Durante trocas genéticas entre células da mesma espécie, ou quando o DNA é introduzido em uma célula por parasitas ou por outros meios, essas endonucleases promovem a inserção do íntron em um local idêntico de outra cópia de DNA de um gene homólogo que não contenha o íntron, em um processo denominado **homing** (endereçoamento, **Figura 26-37**). Enquanto o *homing* do íntron do grupo I se baseia no DNA, o *homing* do íntron do grupo II ocorre por um intermediário de RNA. As endonucleases dos íntrons do grupo II têm uma atividade associada de transcriptase reversa. As proteínas podem formar

complexos com os próprios íntrons de RNA depois que os íntrons sofrem *splicing* dos transcritos primários. Como o processo de *homing* envolve a inserção do íntron de RNA no DNA e a transcrição reversa do íntron, o movimento desses íntrons foi chamado de *retrohoming*. Ao longo do tempo, cada cópia de um gene em particular em uma população pode adquirir o íntron. Muito mais raramente, o íntron pode inserir a si mesmo em uma nova localização em um gene não relacionado. Se esse evento não matar a célula hospedeira, ele pode levar à evolução e à distribuição de um íntron em uma nova localização. As estruturas e os mecanismos usados por íntrons móveis apoiam a ideia de que pelo menos alguns íntrons se originaram como parasitas moleculares, cujo passado evolutivo pode ser traçado aos retrovírus e transposons.

A telomerase é uma transcriptase reversa especializada

Os telômeros, as estruturas nas extremidades dos cromossomos lineares de eucariotos (ver Figura 24-8), geralmente consistem em várias cópias em tandem de uma pequena sequência de oligonucleotídeos. Essa sequência geralmente tem a forma T_xG_y em uma fita e C_yA_x na fita complementen-

FIGURA 26-37 Íntrons que se movem: homing e retrohoming. Certos íntrons incluem um gene (mostrado em vermelho) para enzimas que promovem *homing* (certos íntrons do grupo I) ou *retrohoming* (certos íntrons do grupo II). **(a)** O gene no íntron que sofreu *splicing* é ligado por um ribossomo e traduzido. Os íntrons do grupo I que sofrem *homing* especificam uma endonuclease sítio-específica, chamada de endonuclease *homing*. Os íntrons do grupo II que sofrem *retrohoming* especificam uma proteína tanto com atividades de endonuclease quanto de transcriptase reversa (não mostradas aqui).

(b) Homing. O alelo *a* de um gene *X* contendo um íntron do grupo I que sofre *homing* está presente em uma célula contendo o alelo *b* do mesmo gene, que não possui o íntron. A endonuclease *homing* produzida por *a* cliva *b* na posição que corresponde ao íntron em *a*, e o reparo da quebra da dupla-fita (recombinação com o alelo *a*; ver Figura 25-35) cria, então, uma nova cópia do íntron em *b*. **(c) Retrohoming.** O alelo *a* do gene *Y* contém um íntron do grupo II que sofre *retrohoming*; o alelo *b* não tem o íntron. O íntron que sofre *splicing* insere a si mesmo na fita codificadora de *b* em uma reação que é o inverso do *splicing* que retirou o íntron do transcrito primário (ver Figura 26-15), exceto que, aqui, a inserção é no DNA, em vez de no RNA. A fita de DNA não codificadora de *b* é, então, clivada pela endonuclease/transcriptase reversa codificada no íntron. Essa mesma enzima usa o RNA inserido como um molde para sintetizar uma fita de DNA complementar. O RNA é, então, degradado pelas ribonucleases celulares e substituído por DNA.

tar, onde *x* e *y* estão geralmente na faixa de 1 a 4 (p. 962). Os telômeros variam em comprimento de algumas poucas dúzias de pares de bases em alguns protozoários ciliados a dezenas de milhares de pares de bases em mamíferos. A fita TG é mais longa do que o seu complemento, deixando uma região de DNA de fita simples de até algumas centenas de nucleotídeos na extremidade 3'.

As extremidades de um cromossomo linear não são prontamente replicadas pelas DNA-polimerases celulares. A replicação do DNA precisa de um molde e de um oligonucleotídeo iniciador, e, além da extremidade de uma molécula de DNA linear, nenhum molde está disponível para o pareamento de um oligonucleotídeo iniciador de RNA. Sem um mecanismo especial para duplicar as extremidades, os cromossomos ficariam um pouco menores a cada geração celular. A enzima **telomerase**, descoberta por Carol Greider e Elizabeth Blackburn, soluciona esse problema adicionando telômeros às extremidades do cromossomo.



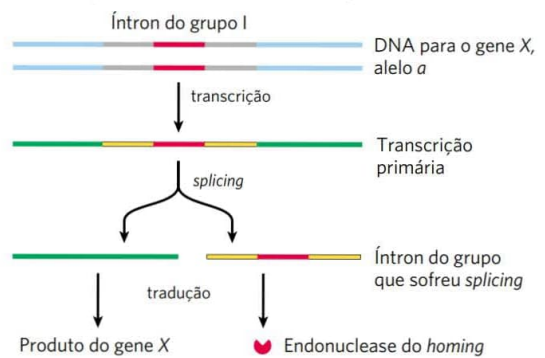
Carol Greider
[Fonte: cortesia de Carol Greider.]



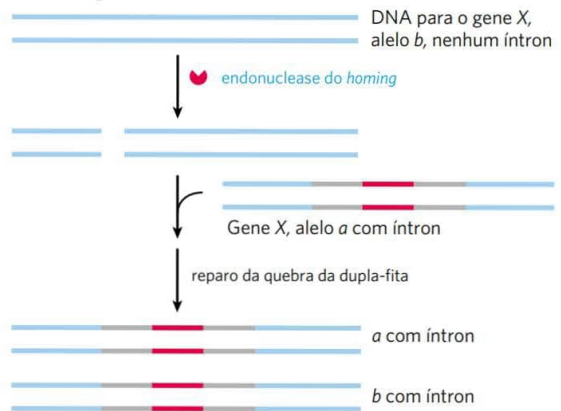
Elizabeth Blackburn
[Fonte: Elisabeth Fall/Fallfoto.com.]

A descoberta e a purificação dessa enzima permitiram evidenciar um mecanismo de reação impressionante e sem precedentes. A telomerase, como algumas outras enzimas

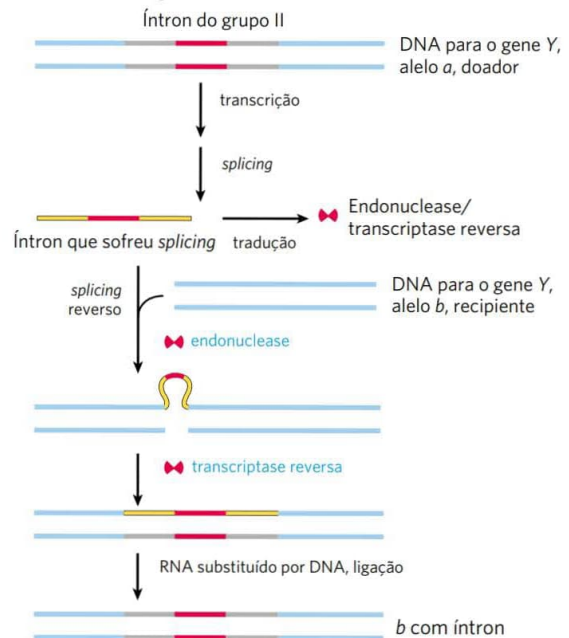
(a) Produção de endonuclease de homing



(b) Homing



(c) Retrohoming



descritas neste capítulo, contém componentes proteicos e de RNA. O componente de RNA tem cerca de 150 nucleotídeos de comprimento e contém cerca de 1,5 cópia da repetição C_yA_x adequada do telômero. Essa região do RNA atua como um molde para a síntese da fita T_xG_y do telômero. A telomerase atua, portanto, como uma transcriptase reversa celular que fornece o sítio ativo para a síntese de DNA dependente de RNA. Ao contrário das transcriptases reversas retrovirais, a telomerase copia apenas um pequeno fragmento de RNA que ela transporta no seu interior. A síntese de telômeros requer a extremidade 3' de um cromossomo como iniciador e prossegue na direção usual 5'→3'. Tendo sintetizado uma cópia da repetição, a enzima se reposiciona para retomar a extensão do telômero (**Figura 26-38a**).

Após a extensão da fita T_xG_y pela telomerase, a fita complementar C_yA_x é sintetizada pelas DNA-polimerases celulares, começando com um oligonucleotídeo iniciador de RNA (ver Figura 25-12). A região de fita simples é protegida por proteínas de ligação específicas em vários eucariotos inferiores, principalmente aquelas espécies com telômeros com menos que algumas centenas de pares de bases. Em eucariotos superiores (incluindo mamíferos) com telômeros de muitos milhares de pares de bases de comprimento, a extremidade de fita única é sequestrada em uma estrutura especializada, chamada de **alça T** (**Figura 26-38b**). A extremidade de fita única é dobrada para trás e pareada com o seu complemento na porção de dupla-fita do telômero. A formação de uma alça T envolve a invasão da extremi-

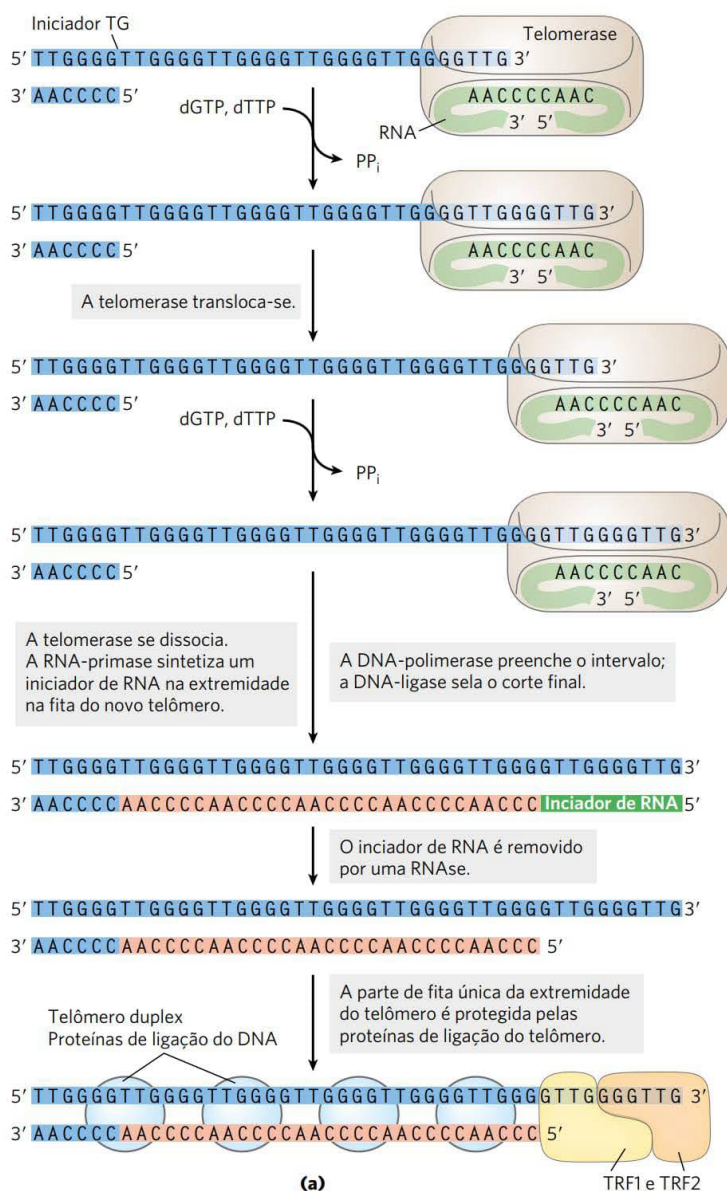


FIGURA 26-38 Síntese e estrutura do telômero.

(a) O molde interno de RNA da telomerase se liga e pareia com o iniciador TG (T_xG_y) de DNA. A telomerase adiciona mais resíduos de T e G ao iniciador TG e, então, reposiciona o molde interno de RNA, a fim de permitir a adição de mais resíduos de T e G, os quais geram a fita TG do telômero. A fita complementar é sintetizada pelas DNA-polimerases celulares após a síntese do iniciador pela RNA-prímase. **(b)** Estrutura proposta de alças T em telômeros. A cauda de fita simples sintetizada pela telomerase é dobrada para trás e pareada com seu complemento na porção duplex do telômero. O telômero é ligado a várias proteínas ligadoras de telômero, incluindo TRF1 e TRF2 (fatores de ligação a repetições teloméricas). **(c)** Eletromicrografia de uma alça T na extremidade de um cromossomo isolado do hepatócito de camundongo. A barra da escala representa um comprimento de 5.000 pb. [Fonte: (c) republicada, com permissão, da Elsevier, de "Mammalian telomeres end in a large duplex loop" de J. D. Griffith, et al., *Cell*, 97(4): 503-514, May 1999; permissão transferida a partir do Copyright Clearance Center, Inc.]

dade 3' da fita simples do telômero, formando um duplex de DNA, talvez por um mecanismo semelhante à iniciação da recombinação genética homóloga (ver Figura 25-35). Em mamíferos, o DNA em alça é ligado por duas proteínas, TRF1 e TRF2, a última envolvida na formação da alça T. Essas alças protegem as extremidades 3' dos cromossomos, tornando-as inacessíveis às nucleases e às enzimas que reparam as interrupções da dupla-fita.

Em protozoários (como *Tetrahymena*), a perda de atividade da telomerase resulta em um encurtamento gradual dos telômeros a cada divisão celular, levando, em última análise, à morte da linhagem celular. Uma ligação semelhante entre o comprimento do telômero e a senescência celular (interrupção da divisão celular) foi observada em seres humanos. Em células germinativas, que contêm atividade de telomerase, os comprimentos dos telômeros são mantidos; em células somáticas, que não apresentam telomerase, eles não o são. Há uma relação linear e inversa entre o comprimento dos telômeros de fibroblastos em cultura e a idade dos indivíduos dos quais os fibroblastos foram retirados: os telômeros em células somáticas humanas encurtam gradualmente à medida que um indivíduo envelhece. Se a transcriptase reversa da telomerase é introduzida em células somáticas humanas *in vitro*, a atividade de telomerase é restaurada, e a duração da vida celular aumenta acentuadamente.

O encurtamento gradual dos telômeros é a chave para o processo de envelhecimento? A duração do nosso ciclo de vida natural é determinada pelo comprimento dos telômeros com os quais os seres humanos nascem? Pesquisas adicionais nessa área devem fornecer algumas informações fascinantes.

Alguns RNA são replicados por RNA-polimerases dependentes de RNA

Além dos retrovírus, os vírus de RNA incluem alguns bacteriófagos de *E. coli*, como f2, MS2, R17 e Q β , assim como vírus eucarióticos, como os vírus *influenza* e Sindbis (este último associado a uma forma de encefalite). Os cromossomos de RNA de fita simples desses vírus também funcionam como mRNA para a síntese de proteínas virais. Eles são replicados na célula hospedeira por uma **RNA-polimerase dependente de RNA (RNA-replicase)**. Todos os vírus de RNA – com exceção dos retrovírus – devem codificar uma proteína com atividade de RNA-polimerase dependente de RNA, seja porque as células hospedeiras não possuem essa enzima ou porque a estrutura do genoma de RNA de um vírus impõe requisitos enzimáticos especializados.

A RNA-replicase da maioria dos bacteriófagos de RNA tem um peso molecular de aproximadamente 210.000 e consiste em quatro subunidades. Uma subunidade (M_r 65.000) é o produto do gene da replicase codificado pelo RNA viral e tem o sítio ativo para replicação. As outras três subunidades são proteínas hospedeiras normalmente envolvidas na síntese proteica da célula hospedeira: os fatores de alongamento da *E. coli*, Tu (M_r 45.000) e Ts (M_r 34.000) (que transportam os aminoacil-tRNAs aos ribossomos), e a proteína S1 (parte integral da subunidade ribossômica 30S). Essas três proteínas hospedeiras podem ajudar a RNA-replicase a localizar e a se ligar às extremidades 3' dos RNA virais.

A RNA-replicase isolada das células de *E. coli* infectadas por Q β catalisa a formação de um RNA complementar ao RNA viral, em uma reação equivalente àquela catalisada por RNA-polimerases dependentes de DNA. A síntese de nova fita de RNA prossegue na direção 5'→3' por um mecanismo químico idêntico àquela usado em todas as outras reações de síntese de ácidos nucleicos que precisam de um molde. A RNA-replicase precisa de RNA como seu molde e não funcionará com DNA. Ela não tem uma atividade de revisão de endonuclease separada e tem uma taxa de erro semelhante àquela da RNA-polimerase. Ao contrário das DNA-polimerases e RNA-polimerases, as RNA-replicases são específicas para o RNA de seu próprio vírus; os RNA da célula hospedeira não são, em geral, replicados. Isso explica como os vírus de RNA são preferencialmente replicados na célula hospedeira, que contém muitos outros tipos de RNA.

As RNA-polimerases dependentes de RNA não estão limitadas a vírus. Enzimas desse tipo são encontradas em plantas, protistas, fungos e alguns animais mais simples, mas não em insetos ou mamíferos. As encontradas nos genomas de eucariotos geralmente desempenham um papel no metabolismo de outra classe de pequenos RNA, chamados de RNA de interferência pequenos (siRNAs), que participam da regulação gênica (Capítulo 28). A maioria das RNA-polimerases dependentes de RNA de eucariotos recebeu pouca atenção experimental.

A síntese de RNA fornece pistas sobre a origem da vida em um mundo de RNA

A complexidade e a ordem extraordinárias que distinguem os sistemas vivos dos inanimados são manifestações essenciais de processos vitais fundamentais. A manutenção do estado vivo requer que transformações químicas *seletivas* ocorram muito rapidamente – principalmente aquelas que usam fontes de energia do meio e sintetizam macromoléculas celulares elaboradas ou especializadas. A vida depende de catalisadores poderosos e seletivos – enzimas – e de sistemas de informação capazes tanto de armazenar de modo seguro o modelo dessas enzimas quanto de reproduzir acuradamente esse modelo geração após geração. Os cromossomos codificam o molde não para a célula, mas para as enzimas que constroem e mantêm a célula. As demandas paralelas por informação e catálise apresentam um enigma clássico: o que veio primeiro, a informação necessária para especificar a estrutura ou as enzimas necessárias para manter e transmitir a informação?

Como pode ter surgido um polímero autorreplicador? Como ele poderia ter mantido a si



Carl Woese
[Fonte: AP Photo.]



Francis Crick, 1916-2004
[Fonte: AP Images.]



Leslie Orgel, 1927-2007
[Fonte: © cortesia do The Salk Institute for Biological Studies.]

mesmo em um meio em que os precursores para a síntese do polímero são escassos? Como poderia a evolução progredir de tal polímero para o mundo moderno de DNA-proteína? Essas perguntas difíceis podem ser abordadas por meio de experimentação cuidadosa, fornecendo pistas a respeito de como a vida na Terra começou e evoluiu.

A revelação da complexidade estrutural e funcional do RNA levou Carl Woese, Francis Crick e Leslie Orgel a proporem, na década de 1960, que essa molécula poderia servir tanto como trans-

portadora de informação quanto como catalisadora. Desde aquela época, pelo menos seis linhas de evidência deram subsídios crescentes à **hipótese do mundo de RNA**.

1. Experimentos de química prebiótica A origem provável das bases de purina e pirimidina é sugerida por experimentos projetados para testar hipóteses acerca da química prebiótica (pp. 33-34). A partir de moléculas simples que se supõe estarem presentes na atmosfera inicial (CH_4 , NH_3 , H_2O , H_2), descargas elétricas, como relâmpagos, geraram, primeiro, moléculas mais reativas, como o HCN e aldeídos, e, então, um conjunto de aminoácidos e ácidos orgânicos (ver Figura 1-35). Quando moléculas como o HCN se tornaram abundantes, as bases purina e pirimidina são sintetizadas em quantidades detectáveis. É eminente que uma solução concentrada de cianeto de amônia, submetida a refluxo por alguns dias, produz adenina com rendimentos de até 0,5% (**Figura 26-39**). A adenina pode muito bem ter sido o primeiro e mais abundante constituinte de nucleotídeo a aparecer na Terra. De modo curioso, a maioria dos cofatores enzimáticos contém adenosina como parte da sua estrutura, embora ela não desempenhe nenhum papel direto na função do cofator (ver Figura 8-41). Talvez isso sugira uma relação evolutiva. Com base na síntese simples de adenina a partir de cianeto, a adenina pode simplesmente ter sido abundante e disponível.

2. A existência de RNA catalíticos Em um “mundo de RNA”, os RNA, não as proteínas, atuam como catalisadores. Talvez mais do que qualquer outra coisa, a descoberta de RNA catalíticos (ribozimas) no início dos anos 80 deu vida à hipótese do mundo de RNA e levou à especulação generalizada de que um mundo de RNA poderia ter sido importante na transição da química prebiótica para a vida (ver Figura 1-37).

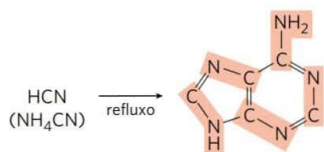


FIGURA 26-39 Possível síntese prebiótica de adenina a partir de cianeto de amônia. A adenina é derivada de cinco moléculas de cianeto, indicadas pelo sombreamento.

O progenitor de toda a vida nesse planeta, no sentido de que ele poderia reproduzir a si mesmo ao longo das gerações da origem da vida ao momento atual, pode ter sido uma molécula de RNA autorreplicadora ou um polímero com características químicas equivalentes.

3. O repertório catalítico em expansão das ribozimas Um polímero autorreplicador usaria rapidamente os suprimentos disponíveis de precursores fornecidos pelos processos relativamente lentos da química prebiótica. Portanto, desde um estágio inicial da evolução, seriam necessárias vias metabólicas para gerar precursores de maneira eficiente, com a síntese de precursores presumivelmente catalisada por ribozimas. As ribozimas encontradas na natureza têm um repertório limitado de funções catalíticas, e não há qualquer vestígio das ribozimas que podem ter um dia existido. A fim de explorar a hipótese do mundo de RNA mais profundamente, é preciso saber se o RNA tem o potencial de catalisar várias reações diferentes necessárias em um sistema primitivo de vias metabólicas.

A busca por RNA com novas funções catalíticas foi auxiliada pelo desenvolvimento de um método que pesquisa rapidamente conjuntos de polímeros aleatórios de RNA e extrai aqueles com atividades específicas; conhecido como **SELEX**, isto é, nada menos que uma evolução acelerada em um tubo de ensaio (Quadro 26-3). Ele tem sido utilizado para gerar moléculas de RNA que se ligam a aminoácidos, corantes orgânicos, nucleotídeos, cianocobalamina e outras moléculas. Os pesquisadores isolaram ribozimas que catalisam a formação de ligações de ésteres e amidas, reações S_2 , metalacção (adição de íons metálicos a) de porfirinas e formação de ligações carbono-carbono. A evolução de cofatores enzimáticos com “alças” de nucleotídeos que facilitam sua ligação a ribozimas pode ter expandido ainda mais o repertório de processos químicos disponíveis para os sistemas metabólicos primitivos.

4. A estrutura do ribossomo Como veremos no Capítulo 27, algumas moléculas de RNA naturais, componentes dos ribossomos, catalisam a formação de ligações peptídicas, oferecendo um vislumbre de como o mundo de RNA poderia ter sido transformado pelo maior potencial catalítico das proteínas. A evolução de uma capacidade de sintetizar proteínas teria sido um evento importante no mundo de RNA, permitindo a geração de polímeros que poderiam estabilizar significativamente estruturas complexas de RNA. No entanto, o início da síntese de peptídeos também teria acelerado o fim do mundo de RNA. As proteínas são simplesmente melhores catalisadores. O papel de transportador da informação do RNA pode ter passado para o DNA, uma vez que ele é quimicamente mais estável. A RNA-replicase e a transcriptase reversa podem ser versões modernas de enzimas que um dia desempenharam papéis importantes em fazer a transição para o sistema moderno baseado em DNA.

5. Vestígios existentes de um mundo de RNA As funções conhecidas do RNA continuam a se multiplicar a cada década. Os retrovírus, outros vírus de RNA e retrotransposons habitam um universo semi-independente, mantendo uma existência parasitária dentro da biosfera. Para os biólogos evolucionistas, essas entidades quase vivas fornecem uma janela

QUADRO 26-3 MÉTODOS O método SELEX para gerar polímeros de RNA com novas funções

O **SELEX** (evolução sistemática de ligantes por enriquecimento exponencial) é usado para gerar **aptâmeros**, oligonucleotídeos selecionados para se ligar firmemente a um alvo molecular específico. O processo é geralmente automatizado para permitir identificação rápida de um ou mais aptâmeros com a especificidade de ligação desejada.

A Figura Q-1 ilustra como o SELEX é usado para selecionar uma espécie de RNA que se liga firmemente ao ATP. Na etapa ①, uma mistura aleatória de polímeros de RNA é submetida à “seleção não natural”, passando-a por uma resina à qual o ATP está ligado. O limite prático para a complexidade de uma mistura de RNA é de cerca de 10^{15} sequências diferentes, o que permite a randomização completa de 25 nucleotídeos ($4^{25} = 10^{15}$). Para RNA maiores, o conjunto de RNA usado para iniciar a busca não inclui todas as sequências possíveis. Os polímeros de RNA que passam através da coluna são descartados (etapa ②); aqueles que se ligam ao ATP são lavados da coluna com solução salina e coletados (etapa ③). Na etapa ④, os polímeros de RNA coletados são amplificados pela transcriptase reversa para construir muitos complementos de DNA para os RNA selecionados; então uma RNA-polimerase faz muitos complementos de RNA a partir das moléculas de DNA resultantes. Finalmente, na etapa ⑤, este novo conjunto de RNA é submetido ao mesmo procedimento de seleção, e o ciclo é repetido uma dúzia de vezes ou mais. Ao final, apenas alguns aptâmeros – nesse caso, as sequências de RNA com afinidade considerável por ATP – permanecem.

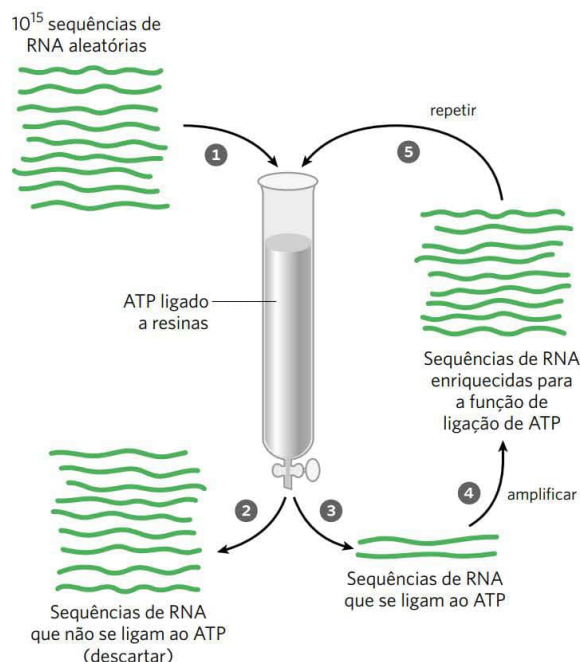


FIGURA Q-1 O procedimento SELEX.

Características de sequência crítica de um aptâmero de RNA que se liga a ATP são mostradas na Figura Q-2; moléculas com essa estrutura geral se ligam ao ATP (e outros nucleotídeos de adenosina) com $K_d < 50 \mu\text{M}$. A Figura Q-3 apresenta a estrutura tridimensional de um aptâmero de RNA de 36 nucleotídeos (mostrado como um complexo com AMP) gerado por SELEX. Esse RNA tem a estrutura básica mostrada na Figura Q-2.



Além do seu uso na exploração da funcionalidade potencial do RNA, o SELEX tem um lado prático importante ao definir os RNA pequenos com uso farmacêutico. Encontrar um aptâmero que se ligue especificamente a cada alvo potencialmente terapêutico pode ser impossível, mas a capacidade do SELEX de selecionar rapidamente e amplificar uma sequência de oligonucleotídeos específicos a partir de um conjunto altamente complexo de sequências o torna uma abordagem promissora para a produção de novas terapias. Por exemplo, poderia-se selecionar um RNA que se liga fortemente a uma proteína receptora proeminente na membrana plasmática de células em um tumor cancerígeno específico. Bloquear a atividade do receptor ou direcionar uma toxina para as células tumorais ao ligá-la ao aptâmero mataria as células. O SELEX também tem sido usado para selecionar aptâmeros de DNA que detectam esporos do antraz. Muitas outras aplicações promissoras se encontram em desenvolvimento. ■

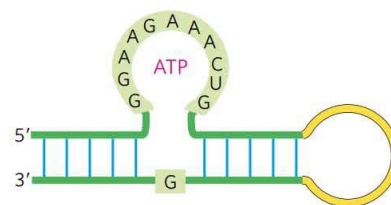


FIGURA Q-2 Aptâmero de RNA que se liga ao ATP. Os nucleotídeos sombreados são aqueles necessários para a atividade de ligação.

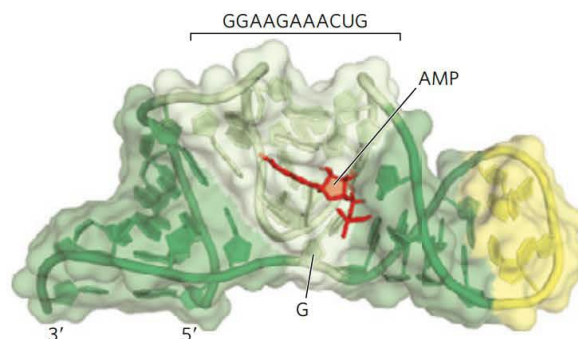


FIGURA Q-3 Aptâmero de RNA ligado ao AMP. As bases dos nucleotídeos conservados (formando o bolsão de ligação) estão em verde-claro; o AMP ligado está em vermelho. [Fonte: informação de PDB ID 1RAW, T. Dieckmann et al., *RNA* 2:628, 1996.]

sobre os principais passos da evolução da vida. Os transposons podem ter sido uma inovação inicial em um mundo de RNA. Com a aparência dos primeiros autorreplicadores ineficientes, a transposição pode ter sido uma alternativa potencialmente importante à replicação como uma estratégia para a reprodução bem-sucedida e a sobrevivência. Os RNA dos parasitas em épocas precoces iriam simplesmente se transformar em uma molécula autorreplicadora por meio de transesterificação catalisada e, então, sofrer replicação passivamente. A seleção natural teria levado a transposição a ser sítio-específica, tendo como alvo sequências que não interfeririam com as atividades catalíticas do RNA hospedeiro. Os replicadores e os transposons de RNA podem ter existido em uma relação simbiótica primitiva, cada um contribuindo para a evolução do outro. Os íntrons modernos, os retrovírus e os transposons podem todos ser vestígios de uma estratégia de “sobreposição” seguida por RNA dos parasitas precoces. Esses elementos continuam a fazer importantes contribuições para a evolução dos seus hospedeiros.

6. Progresso na busca por um replicador de RNA A hipótese do mundo de RNA precisa de um polímero de nucleotídeos para reproduzir a si mesmo. Uma ribozima pode acarretar sua própria síntese a partir de um molde? Os pesquisadores estão próximos de encontrar essa ribozima ou um sistema de ribozimas. Por exemplo, em 2009, Gerald Joyce e colaboradores relataram o primeiro conjunto de duas ribozimas que poderiam fazer a catálise cruzada da formação de cada uma (**Figura 26-40**). Uma ribozima, E, catalisa a ligação de dois oligonucleotídeos (A' e B') para criar uma segunda ribozima complementar denominada E'. E' poderia, então, catalisar a ligação de dois outros oligonucleotídeos (A e B) para formar outra molécula de E. Nesse sistema, a formação de E e E' foi baseada em molde, e as quantidades cresceram exponencialmente enquanto substratos estiveram disponíveis, e as proteínas, ausentes. O sistema evoluiu, de modo que enzimas mais eficientes apareceram na população. Em 2011, Philipp Holliger e colaboradores descobriram uma ribozima mais geral semelhante à RNA-polimerase.

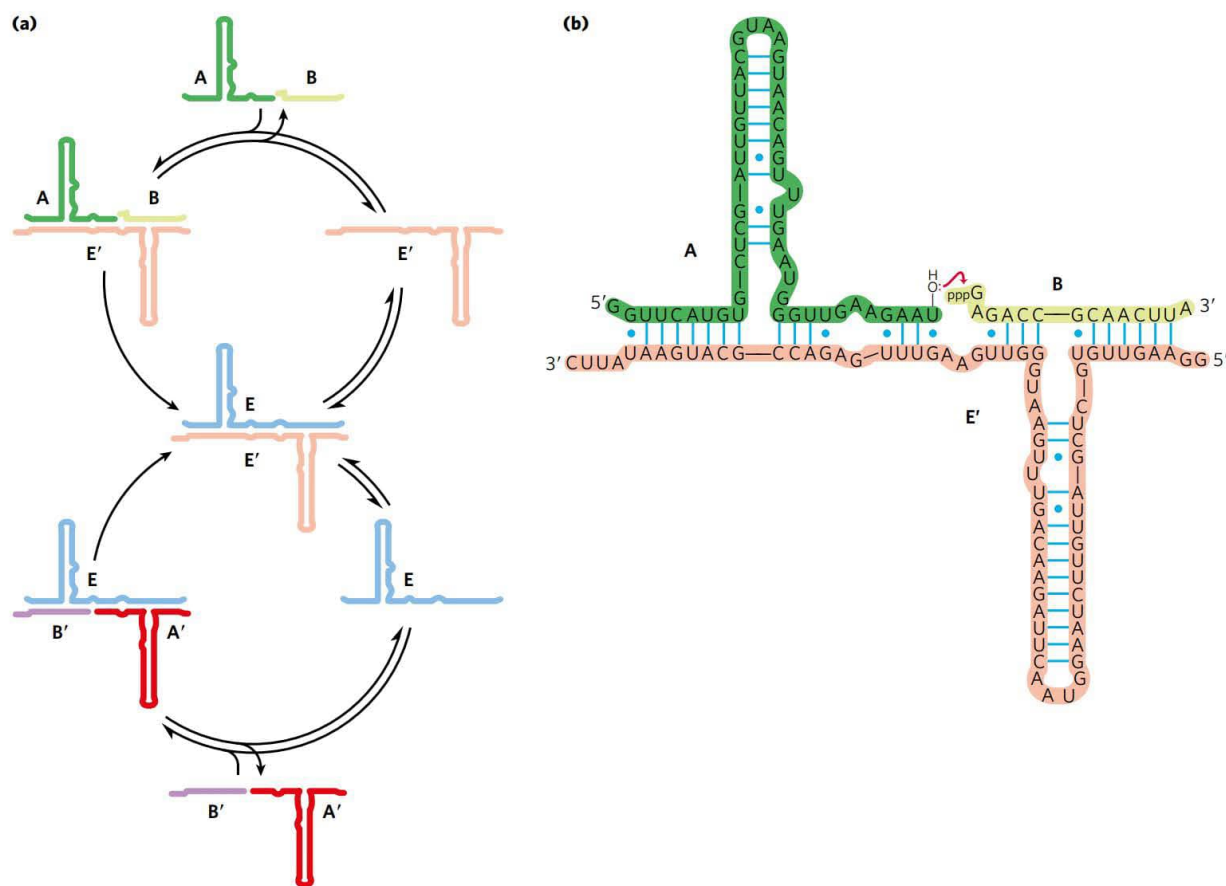


FIGURA 26-40 Replicação autossustentada de uma enzima de RNA. Esse sistema tem muitas propriedades de um sistema vivo. As moléculas de RNA incorporam informação e função catalítica, e as reações produzem um aumento exponencial nos RNA produzidos. Quando variantes dos substratos de RNA são introduzidas, o sistema sofre seleção natural, de modo que os melhores replicadores acabam dominando a população. **(a)** Um possível esquema de reação. Os oligorribonucleotídeos A e B hibridizam com a ribozima E' e são ligados cataliticamente para formar a ribozima E. A união dos oligorribonucleotídeos A' e B' é catalisada de modo semelhante pela ribozima E. Os níveis de E e E' crescem exponencialmente, com um tempo de duplicação de cerca de uma hora a 42°C, desde que haja um suprimento de precursores A, B, A' e B'. **(b)** A reação de ligação envolve ataque da 3' OH de um oligorribonucleotídeo no fosfato α do 5'-trifosfato do outro oligorribonucleotídeo. O pirofosfato é liberado. O pareamento de bases dos substratos com a ribozima desempenha um papel fundamental em alinhar os substratos para a reação. [Fonte: informações de T. A. Lincoln e G. F. Joyce, *Science* 323:1229, 2009.]

Embora o mundo de RNA permaneça uma hipótese, com muitas lacunas ainda a serem explicadas, evidências experimentais dão apoio a uma lista crescente de seus elementos-chave. Experimentação adicional deve aumentar nosso entendimento. Pistas importantes para o quebra-cabeças serão encontradas nos trabalhos da química fundamental, em células vivas, ou talvez em outros planetas.

RESUMO 26.3 Síntese de RNA e DNA dependente de RNA

- As DNA-polimerases dependentes de RNA, também chamadas de transcriptases reversas, foram descobertas primeiro em retrovírus, que devem converter seus genomas de RNA em DNA de dupla-fita como parte do seu ciclo vital. Essas enzimas transcrevem o RNA viral em DNA, um processo que pode ser usado experimentalmente para formar DNA complementar.
- Muitos transposons de eucariotos são relacionados a retrovírus, e seu mecanismo de transposição inclui um RNA intermediário.
- Telomerase, a enzima que sintetiza as extremidades do telômero dos cromossomos lineares, é uma transcriptase reversa especializada que contém um molde interno de RNA.
- As RNA-polimerases dependentes de RNA, como as replicases dos bacteriófagos RNA, são específicas de molde para o RNA viral.
- A existência de RNA catalíticos e vias para a interconversão de RNA e DNA estão entre as várias linhas de pesquisa que dão subsídios à hipótese do mundo de RNA. O potencial bioquímico dos RNA pode ser explorado pelo SELEX, um método para selecionar rapidamente sequências de RNA com propriedades catalíticas ou específicas.

Termos-chave

Termos em negrito estão definidos no glossário.

transcrição 1035	fatores de transcrição 1044
RNA mensageiro (mRNA) 1035	ribozimas 1047
RNA transportador (tRNA) 1035	transcrito primário 1047
RNA ribossômico (rRNA) 1035	splicing de RNA 1047
transcriptoma 1035	5' cap 1048
RNA-polimerase dependente de DNA 1036	esplíceossomo 1050
fita-molde 1037	RNA nuclear pequeno (snRNA) 1050
fita não molde 1037	cauda poli(A) 1053
fita codificadora 1037	poliadenilato-polimerase 1053
promotor 1038	splicing alternativo 1054
sequência-consenso 1038	escolha do sítio de poli(A) 1055
proteína receptora de cAMP (CRP) 1039	RNA nucleolar pequeno (snoRNA) 1057
repressor 1039	snoRNP 1057
footprinting 1040	microRNA (miRNA) 1059

sequência-guia interna 1060	homing 1067
exossomo 1062	telomerase 1068
polinucleotídeo-fosforilase 1063	alça T 1069
transcriptase reversa 1064	RNA-polimerase dependente de RNA (RNA-replicase) 1070
retrovírus 1065	SELEX 1071
DNA complementar (cDNA) 1065	aptâmero 1072

Teste seu conhecimento

1. RNA-polimerase (a) Quanto tempo demoraria para a RNA-polimerase da *E. coli* sintetizar o transcrito primário dos genes de *E. coli* que codificam as enzimas para o metabolismo da lactose, o operon *lac* de 5.300 pb (considerado no Capítulo 28)? (b) Quanto se move ao longo do DNA a “bolha” formada pela RNA-polimerase em 10 segundos?

2. Erro de conexão por RNA-polimerases As DNA-polimerases são capazes de edição e correção de erros, ao passo que a capacidade de correção de erros nas RNA-polimerases parece ser bastante limitada. Uma vez que um erro de uma única base na replicação ou na transcrição pode levar a um erro na síntese proteica, sugira uma explicação biológica possível para essa diferença.

3. Processamento do RNA pós-transcricional Faça a predição dos prováveis efeitos de uma mutação na sequência (5') AAUAAA no transcrito de um mRNA de eucariotos.

4. Fita codificadora versus fita-molde O genoma do RNA do fago Q β é a fita não molde, ou fita codificadora, e, quando introduzido na célula, funciona como um mRNA. Suponha que a RNA-replicase do fago Q β tenha sintetizado primariamente uma fita-molde de RNA e singularmente a incorporado, em vez de fitas não molde, nas partículas virais. Qual seria o destino das fitas-molde quando elas entram em uma nova célula? Que enzima teria de ser incluída nas partículas virais para uma invasão bem-sucedida de uma célula hospedeira?

5. Transcrição O gene codificando a enzima β -galactosidase da *E. coli* inicia com a sequência ATGACCATGATTACG. Qual é a sequência do transcrito de RNA especificado por essa parte do gene?

6. A química da biossíntese de ácidos nucleicos Descreva três propriedades comuns às reações catalisadas por DNA-polimerase, RNA-polimerase, transcriptase reversa e RNA-replicase. Como a enzima polinucleotídeo-fosforilase é semelhante e diferente de cada uma dessas quatro enzimas?

7. Splicing de RNA Qual é o número mínimo de reações de transesterificação necessário para realizar *splicing* de um íntron a partir de um transcrito de mRNA? Explique.

8. Processamento de RNA Se o *splicing* de mRNA em uma célula de vertebrado é bloqueado, as reações de modificação do rRNA também são bloqueadas. Sugira uma razão para isso.

9. Genomas de RNA Os vírus de RNA têm genomas relativamente pequenos. Por exemplo, os RNA de fita simples de retrovírus têm cerca de 10.000 nucleotídeos, e o RNA Q β tem apenas 4.220 nucleotídeos de comprimento. Dadas as proprie-

dades da transcriptase reversa e da RNA-replicase descritas neste capítulo, sugira uma razão para o tamanho pequeno desses genomas virais.

10. Rastreamento de RNA pela SELEX O limite prático para o número de diferentes sequências de RNA que pode ser rastreado em um experimento SELEX é de 10^{15} . (a) Suponha que você está trabalhando com oligonucleotídeos de 32 nucleotídeos de comprimento. Quantas sequências existem em um conjunto aleatório, contando cada sequência possível? (b) Que percentual dessas sequências pode ser rastreado em um experimento SELEX? (c) Suponha que você deseja selecionar uma molécula de RNA que catalisa a hidrólise de um éster em particular. A partir do que você sabe sobre catálise, proponha uma estratégia SELEX que possa lhe permitir selecionar o catalisador apropriado.

11. Morte lenta O cogumelo mortal, *Amanita phalloides*, contém várias substâncias perigosas, incluindo a letal α -amanitina. Essa toxina bloqueia o alongamento do RNA em consumidores do cogumelo ao se ligar à RNA-polimerase II de eucariotos com muita afinidade; ela é mortal em concentrações tão baixas quanto 10^{-8} M. A reação inicial à ingestão do cogumelo é a de distúrbio gastrointestinal (causado por algumas outras toxinas). Esses sintomas desaparecem, porém, cerca de 48 horas depois, o consumidor dos cogumelos morre, geralmente de disfunção hepática. Levante hipóteses sobre por que demora tanto tempo para a α -amanitina matá-lo.



12. Detecção de linhagens de tuberculose resistentes à rifampicina

A rifampicina é um importante antibiótico usado para tratar a tuberculose e outras doenças micobacterianas. Algumas linhagens de *Mycobacterium tuberculosis*, o agente causador da tuberculose, são resistentes à rifampicina. Essas linhagens se tornam resistentes por meio de mutações que alteram o gene *rpoB*, que codifica a subunidade β da RNA-polimerase. A rifampicina não pode se ligar à RNA-polimerase mutante e, assim, não é capaz de bloquear a iniciação da transcrição. As sequências de DNA de um grande número de linhagens de *M. tuberculosis* resistentes à rifampicina apresentaram mutações em uma região específica de 69 pb do *rpoB*. Uma linhagem resistente à rifampicina bem caracterizada tem a alteração de um único par de bases no *rpoB*, que resulta na substituição de um resíduo de His por um resíduo de Asp na subunidade β .

- Com base no seu conhecimento da química de proteínas, sugira uma técnica que permita a detecção de uma linhagem resistente à rifampicina contendo essa proteína mutante específica.
- Com base no seu conhecimento da química de ácidos nucleicos, sugira uma técnica para identificar a forma mutante do *rpoB*.

Bioquímica online

13. O gene da ribonuclease A ribonuclease pancreática humana tem 128 resíduos de aminoácidos.

- Qual é o número mínimo de pares de nucleotídeos necessários para codificar essa proteína?
- O mRNA expresso em células pancreáticas humanas foi copiado com a transcriptase reversa para criar uma “biblio-

teca” de DNA humano. A sequência do mRNA que codifica a ribonuclease pancreática humana foi determinada pelo sequenciamento do DNA complementar (cDNA) a partir dessa biblioteca, que incluiu uma fase de leitura aberta para essa proteína. Use o banco de dados de nucleotídeos do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide) para encontrar a sequência publicada desse mRNA. (Procure pelo número de acesso D26129.) Qual é o comprimento desse mRNA?

- Como você pode explicar a discrepância entre o tamanho que você calculou em (a) e o tamanho real do mRNA?

Problema de análise de dados

14. O caso da edição do RNA O receptor AMPA (ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazolepropionico) é um componente importante do sistema nervoso humano. Ele está presente sob várias formas, em diferentes neurônios, e parte dessa variedade resulta de modificação pós-transcricional. Esse problema explora a pesquisa no mecanismo de edição do RNA.

Um relato inicial de Sommer e coautores (1991) abordou a sequência que codifica um resíduo-chave de Arg no receptor AMPA. A sequência do cDNA (ver Figura 9-14) para o receptor AMPA mostrou um códon CGG (Arg; ver Figura 27-7) para esse aminoácido. De modo surpreendente, o DNA genômico mostrou um códon CAG (Gln) nessa posição.

- Explique como esse resultado é consistente com a modificação pós-transcricional do mRNA do receptor AMPA.

Rueter e colaboradores (1995) investigaram esse mecanismo detalhadamente. Primeiro, eles desenvolveram um ensaio com base no método de Sanger de sequenciamento de DNA para diferenciar entre transcritos editados e não editados (ver Figura 8-34). Eles modificaram a técnica para determinar se a base em questão era um A (como em CAG), ou não. Eles planejaram dois iniciadores de DNA com base na sequência genômica do DNA dessa região do gene AMPA. Esses iniciadores e a sequência de DNA genômico da fita não molde para a região relevante do gene receptor do AMPA estão mostrados ao final da página; o resíduo A editado está em vermelho.

A fim de detectar se esse A estava presente ou foi editado por outra base, Rueter e colaboradores usaram o seguinte procedimento:

- Prepararam cDNA complementar ao mRNA, usando o iniciador 1, transcriptase reversa, dATP, dGTP, dCTP e dTTP.
- Removeram o mRNA.
- Hibridizaram o iniciador 2 marcado com ^{32}P com o cDNA e deixaram reagir com DNA-polimerase, dGTP, dCTP, dTTP e ddATP (didesóxi ATP; ver Figura 8-34).
- Desnaturaram os duplexes resultantes e os separaram com eletroforese em gel de poliácridamida (ver Figura 3-18).
- Detectaram espécies de DNA marcado com ^{32}P por meio de autorradiografia.

Eles descobriram que o mRNA editado produziu um DNA[^{32}P] de 22 nucleotídeos, ao passo que um mRNA não editado produziu um DNA[^{32}P] de 19 nucleotídeos.

- Usando as sequências a seguir, explique como os mRNA editados e não editados resultaram nesses diferentes produtos.

(5') ...GTCCTCTGGTTCCTTGGGTGCCTTTATGCA GCAAGGATGCGATATTTCCGCAAG...
 Iniciador 1: CGTTCC TAC GCTATAAAGCGGTTC (5')
 Iniciador 2: (5')CCTTGGGTGCCTTTA

Usando o mesmo procedimento para medir a proporção de transcritos editada sob diferentes condições, os pesquisadores descobriram que extratos de células epiteliais em cultura (uma linhagem celular comum, chamada de HeLa) poderiam editar o mRNA em um nível superior. A fim de determinar a natureza do maquinário de edição, eles pré-trataram um extrato celular ativo HeLa, como descrito na tabela a seguir, e mediram sua capacidade de editar o mRNA do AMPA. A proteinase K degrada apenas proteínas; a nuclease de micrococos, apenas DNA.

Amostra	Pré-tratamento	% de mRNA editado
1	Nenhum	18
2	Proteinase K	5
3	Aquecimento até 65°C	3
4	Aquecimento até 85°C	3
5	Nuclease de micrococos	17

- (c) Use esses dados para argumentar que a máquina de edição consiste em proteína. Qual é uma fragilidade importante nesse argumento?

Para determinar a natureza exata da base editada, Rueter e colaboradores usaram o seguinte procedimento:

1. Produziram mRNA, usando $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ na mistura de reação.
2. Editaram o mRNA marcado pela incubação do extrato HeLa.
3. Hidrolisaram o mRNA editado com nuclease P1 para produzir nucleotídeos monofosfatos isolados.
4. Separaram os nucleotídeos monofosfatos com cromatografia de camada fina (TLC; ver Figura 10-25b).
5. Identificaram com autorradiografia os nucleotídeos monofosfatos resultantes marcados com ^{32}P .

Em mRNA não editado, encontraram apenas $[\text{P}^{32}]\text{AMP}$; em mRNA editado encontraram principalmente $[\text{P}^{32}]\text{AMP}$ com alguns $[\text{P}^{32}]\text{IMP}$ (inosina monofosfato; ver Figura 22-36).

- (d) Por que foi necessário usar $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, em vez de $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ou $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, nesse experimento?
- (e) Por que foi necessário usar $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, em vez de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ ou $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$?
- (f) Como o resultado exclui a possibilidade que todo o nucleotídeo A (açúcar, base e fosfato) foi removido e substituído por um nucleotídeo I durante o processo de edição?

Em seguida, os pesquisadores editaram o mRNA que foi marcado com $[2,8\text{-}^3\text{H}]\text{ATP}$ e repetiram o procedimento acima. Os únicos mononucleotídeos produzidos marcados com ^3H foram o AMP e o IMP.

- (g) Como esse resultado exclui a remoção da base A (deixando intacto o esqueleto de açúcar-fosfato) seguido pela substituição com uma base I como mecanismo de edição? Qual, então, é o mecanismo mais provável de edição nesse caso?
- (h) Como a mudança de um A para um resíduo I no mRNA explica uma alteração de Gln para Arg na sequência de proteínas nas duas formas da proteína receptora AMPA? (Dica: ver Figura 27-8.)

Referências

- Rueter, S.M., C.M. Burns, S.A. Coode, P. Mookherjee e R.B. Emeson. 1995.** Glutamate receptor RNA editing in vitro by enzymatic conversion of adenosine to inosine. *Science* 267:1491–1494.
- Sommer, B., M. Köhler, R. Sprengel e P.H. Seeburg. 1991.** RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell* 67:11–19.

Metabolismo de proteínas

- 27.1 O código genético 1078
 27.2 Síntese proteica 1088
 27.3 Endereçamento e degradação das proteínas 1114

As proteínas são os produtos da maioria das vias de informação. A toda hora, uma célula qualquer necessita de milhares de proteínas diferentes, as quais precisam ser sintetizadas em resposta às necessidades da célula naquele momento, transportadas (direcionadas) para locais apropriados na célula e degradadas quando não mais se fizerem necessárias. Muitos dos componentes e dos mecanismos básicos utilizados pela maquinaria de síntese proteica são notavelmente bem conservados em todas as formas de vida, de bactérias até eucariotos, o que indica que esses componentes e mecanismos já estavam presentes no ancestral comum universal mais remoto de todos os organismos existentes hoje (LUCA, do inglês, *last universal common ancestor*).

A compreensão da síntese proteica, o mais complexo processo de biossíntese, tem sido um dos maiores desafios da bioquímica. A síntese proteica em eucariotos envolve mais de 70 proteínas ribossômicas diferentes; 20 ou mais enzimas para ativar os precursores de aminoácidos; uma dúzia ou mais de enzimas auxiliares e outros fatores proteicos para as etapas de iniciação, alongamento e término de polipeptídeos; talvez 100 enzimas adicionais para o processamento final das diferentes proteínas e 40 ou mais tipos diferentes de RNA transportadores e ribossômicos. Ao todo, quase 300 macromoléculas diferentes cooperam para a síntese de polipeptídeos. Muitas dessas macromoléculas estão entre as mais abundantes encontradas em qualquer célula. Algumas estão organizadas dentro da estrutura tridimensional complexa do ribossomo.

Para se ter uma ideia do quanto a síntese proteica é importante para a célula, considere os recursos celulares destinados a esse processo. A síntese proteica chega a consumir 90% do total da energia que uma célula utiliza para reações

biossintéticas. Todas as células de bactérias, arqueobactérias e eucariotos contêm de algumas a milhares de cópias de diferentes proteínas e RNA. Os 15 mil ribossomos, 100 mil moléculas de enzimas e fatores proteicos envolvidos na síntese proteica e 200 mil moléculas de tRNA em uma célula bacteriana típica correspondem a mais de 35% da massa seca da célula.

Apesar da grande complexidade dos processos envolvidos na síntese proteica, as proteínas são produzidas de uma maneira extraordinariamente rápida. Um polipeptídeo de 100 resíduos de aminoácidos é sintetizado por uma célula de *Escherichia coli* (a 37°C) em cerca de 5 segundos. A síntese de milhares de proteínas diferentes em uma célula é fortemente regulada, de modo que as cópias são feitas apenas em número suficiente para suprir as necessidades metabólicas daquele dado momento. Para manter a combinação e as concentrações apropriadas de proteínas, os processos de endereçamento e degradação devem estar sincronizados com o de síntese. As pesquisas estão, gradativamente, descobrindo essa coreografia celular finamente coordenada que guia cada proteína para o seu local apropriado na célula e que degrada essa proteína seletivamente quando ela não é mais necessária.

O estudo da síntese proteica oferece outra satisfação importante: a visão de um mundo de catalisadores de RNA que pode ter existido antes do início da vida “como a conhecemos”. A elucidação sobre a estrutura tridimensional dos ribossomos, que teve início no ano 2000, tem nos proporcionado uma visão cada vez mais detalhada dos mecanismos de síntese proteica. Também confirmou uma hipótese que havia sido levantada primeiramente por Harry Noller duas décadas atrás: as proteínas são sintetizadas por uma gigantesca enzima formada por RNA!



Harry Noller
 [Fonte: cortesia de Harry Noller.]

27.1 O código genético



Paul Zamecnik, 1912-2009
[Fonte: Archives and Special Collections, Massachusetts General Hospital.]

Três grandes avanços criaram o cenário para o nosso conhecimento atual sobre a biossíntese de proteínas. Primeiro, no início da década de 1950, Paul Zamecnik e colaboradores planejaram uma série de experimentos para investigar onde as proteínas são sintetizadas na célula. Eles injetaram aminoácidos radioativos em ratos e, a intervalos diferentes de tempo após a injeção, retiraram o fígado, homogeneizaram-no, fracionaram o material homogeneizado por centrifugação e examinaram a presença

de proteína radioativa nas frações subcelulares. Quando se decorriam horas ou dias após a injeção dos aminoácidos marcados, *todas* as frações subcelulares continham proteínas marcadas. Por outro lado, quando se deixava passar apenas alguns minutos, as proteínas marcadas apareciam somente em uma fração contendo pequenas partículas de ribonucleoproteínas. Essas partículas, visíveis nos tecidos animais por microscopia eletrônica, foram, então, identificadas como o local da síntese proteica a partir dos aminoácidos e, mais tarde, foram denominadas ribossomos (**Figura 27-1**).

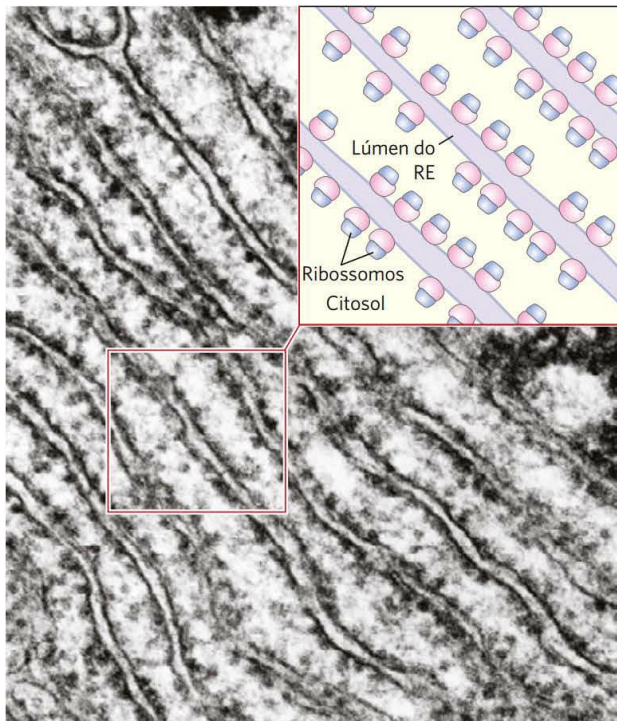


FIGURA 27-1 Ribossomos e retículo endoplasmático. Micrografia eletrônica e desenho esquemático de uma porção de uma célula pancreática, mostrando os ribossomos aderidos à superfície externa (citoplasmática) do retículo endoplasmático (RE). Os ribossomos são os numerosos pontos ao longo das camadas paralelas de membrana. [Fonte: Joseph F. Gennaro Jr./Science Source.]

O segundo avanço-chave foi feito por Mahlon Hoagland e Zamecnik, quando eles descobriram que os aminoácidos são “ativados” para a síntese proteica quando incubados com ATP e a fração citoplasmática das células hepáticas. Os aminoácidos se ligavam a um RNA termoestável solúvel do tipo que havia sido descoberto e caracterizado por Robert Holley e, posteriormente, denominado RNA transportador (tRNA), para formar **aminoacil-tRNA**. As enzimas que catalisam esse processo são as **aminoacil-tRNA-sintetases**.

O terceiro avanço resultou dos argumentos de Francis Crick acerca de como a informação genética codificada na linguagem de quatro letras dos ácidos nucleicos era capaz de ser traduzida na linguagem de 20 letras das proteínas. Um pequeno ácido nucleico (talvez RNA) poderia ter o papel de um adaptador, e uma parte da molécula adaptadora ligaria um aminoácido específico, ao passo que outra parte reconheceria a sequência nucleotídica que codifica aquele aminoácido no mRNA (**Figura 27-2**). Essa ideia foi logo confirmada. O tRNA adaptador, a mesma molécula que ativa o aminoácido para a formação da ligação peptídica, também “traduz” a sequência de nucleotídeos de um mRNA na sequência de aminoácidos de um polipeptídeo. O processo geral da síntese proteica dirigida por mRNA é com frequência chamado simplesmente de **tradução**.

Esses três avanços logo levaram à identificação das três etapas principais da síntese proteica e, finalmente, à elucidação do código genético que especifica cada aminoácido.

O código genético foi decifrado utilizando-se moldes artificiais de mRNA

Por volta da década de 1960, já era evidente que pelo menos três resíduos de nucleotídeos no DNA eram necessários para codificar cada aminoácido. As quatro letras do código de DNA (A, T, G e C), em grupos de dois, podem gerar apenas $4^2 = 16$ combinações diferentes, o que é insuficiente para codificar 20 aminoácidos. Grupos de três, no entanto, geram $4^3 = 64$ combinações diferentes.

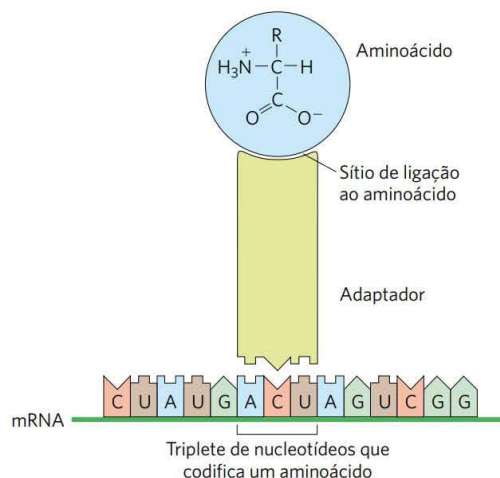


FIGURA 27-2 A hipótese de um adaptador proposta por Crick. Hoje, sabe-se que o aminoácido está ligado covalentemente à extremidade 3' de uma molécula de tRNA e que um triplete de nucleotídeos específico em outra parte do tRNA interage com um códon triplete específico do mRNA por meio de ligações de hidrogênio entre bases complementares.

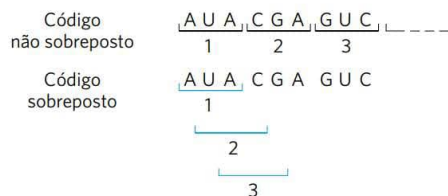


FIGURA 27-3 Códigos genéticos com e sem sobreposição. Em um código sem sobreposição, os códons (enumerados consecutivamente) não compartilham nucleotídeos. Em um código com sobreposição, alguns nucleotídeos no mRNA são compartilhados por diferentes códons. Em um código triplete com sobreposição máxima, muitos nucleotídeos, como, por exemplo, o terceiro nucleotídeo da esquerda para a direita (A), são compartilhados por três códons. Observe que, em um código com sobreposição, a sequência triplete do primeiro códon limita as sequências possíveis para o segundo códon. Um código sem sobreposição permite muito mais flexibilidade para as sequências triplete dos códons vizinhos e, portanto, para as possíveis sequências de aminoácidos designadas pelo código. Hoje, sabe-se que o código genético utilizado por todos os sistemas vivos é sem sobreposição.

Várias propriedades-chave do código genético foram estabelecidas nos primeiros estudos genéticos (**Figuras 27-3 e 27-4**). Um **códon** é uma trinca de nucleotídeos que codifica um aminoácido específico. A tradução ocorre de forma que essas trincas de nucleotídeos sejam lidas de maneira sucessiva e sem sobreposição. Um primeiro códon específico na sequência estabelece a **fase de leitura**, na qual, a cada três resíduos de nucleotídeos, inicia-se um novo códon. Não há interrupção entre os códons para os resíduos de aminoácidos sucessivos. A sequência de aminoácidos de uma proteína é definida por uma sequência linear de trincas contíguas. A princípio, qualquer sequência de DNA de fita simples ou mRNA tem três fases de leitura possíveis. Cada fase de leitura apresenta uma sequência diferente de códons (**Figura 27-5**), mas apenas uma deverá codificar uma dada proteína. Ainda restava uma questão-chave: quais seriam as palavras de três letras que codificam para cada aminoácido?



Marshall Nirenberg,
1927-2010
[Fonte: AP Photo.]

Em 1961, Marshall Nirenberg e Heinrich Matthaei relataram a primeira grande descoberta nesse sentido. Eles incubaram poliuridilato sintético, poli(U), com um extrato de *E. coli*, GTP, ATP e uma mistura dos 20 aminoácidos em 20 tubos diferentes, cada um contendo um dos aminoácidos marcado radioativamente. Como o mRNA poli(U) é constituído por muitas trincas UUU sucessivas, ele deveria codificar a síntese de um polipeptídeo contendo apenas o

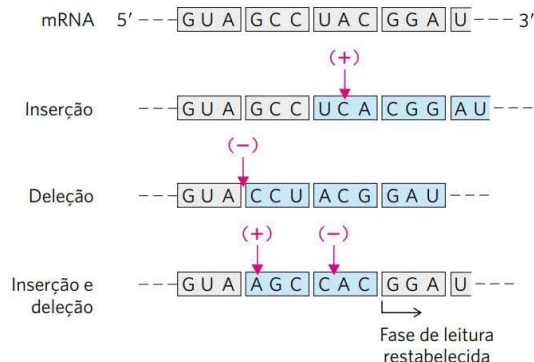


FIGURA 27-4 O código sem sobreposição em trinca. As evidências para a natureza geral do código genético vieram de muitos tipos de experimentos, incluindo experimentos genéticos sobre os efeitos de mutações por deleção e por inserção. Inserir ou deletar um par de bases (mostrados aqui no transcrito de mRNA) altera a sequência de trincas em um código sem sobreposição; todos os aminoácidos codificados pelo mRNA após a mudança são afetados. A combinação de mutações por inserção e por deleção afeta alguns aminoácidos, mas pode, eventualmente, restabelecer a sequência correta de aminoácidos. A adição ou remoção de três aminoácidos (não mostrado) mantém as demais trincas intactas, evidenciando que o códon é constituído por três, e não quatro ou cinco, nucleotídeos. Os códons de trincas sombreados em cinza são aqueles traduzidos a partir do gene original; os códons mostrados em azul são códons novos, resultantes de mutações por inserção ou deleção.

aminoácido codificado por UUU. De fato, um polipeptídeo radioativo foi formado em apenas um dos 20 tubos, aquele que continha fenilalanina radioativa. Assim, Nirenberg e Matthaei concluíram que o códon UUU codifica a fenilalanina. A mesma abordagem logo mostrou que policitidilato, poli(C), codifica um polipeptídeo contendo apenas prolina (poliprolina), e poliadenilato, poli(A), codifica polilisina. O poliguanilato não deu origem a qualquer polipeptídeo nesse experimento, pois forma, espontaneamente, tetrades (ver Figura 8-20d) que não se ligam nos ribossomos.

Os polinucleotídeos sintéticos utilizados nesse experimento foram preparados usando polinucleotídeo-fosforilase (p. 1063), que catalisa a formação de polímeros de RNA a partir de ADP, UDP, CDP e GDP. Essa enzima, descoberta por Severo Ochoa, não necessita de molde e forma polímeros com uma composição de bases que reflete diretamente as concentrações relativas dos precursores, os nucleosídeos 5'-difosfatos presentes no meio. Se a polinucleotídeo-fosforilase for colocada em meio contendo apenas UDP, ela formará apenas poli(U). Se estiver presente uma mistura contendo cinco partes de ADP e uma parte de CDP, ela formará um polímero no qual cerca de cinco sextos dos resíduos são adenilil e um sexto é citidilato. Esse polímero aleatório provavelmente terá muitas trincas com a sequência AAA, números menores de trincas AAC, ACA e CAA, relativamente

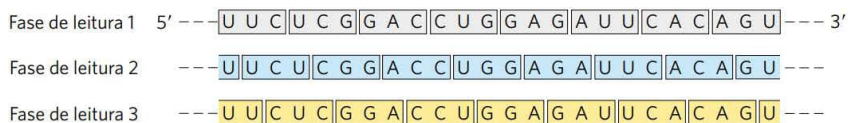


FIGURA 27-5 Quadros de leitura no código genético. Em um código de trincas sem sobreposição, todos os mRNA têm três fases de leitura possíveis, mostradas aqui em cores diferentes. As trincas e, consequentemente, os aminoácidos codificados são diferentes em cada fase de leitura.

TABELA 27-1 Incorporação de aminoácidos em polipeptídeos em resposta a polímeros aleatórios de RNA

Aminoácido	Frequência de incorporação observada (Lys = 100)	Atribuição provisória da composição de nucleotídeos do códon correspondente ^a	Frequência esperada de incorporação com base na proposta (Lys = 100)
Asparagina	24	A ₂ C	20
Glutamina	24	A ₂ C	20
Histidina	6	AC ₂	4
Lisina	100	AAA	100
Prolina	7	AC ₂ , CCC	4,8
Treonina	26	A ₂ C, AC ₂	24

Nota: aqui, é apresentado um resumo dos dados de uma parte dos primeiros experimentos planejados para elucidar o código genético. Um RNA sintético contendo apenas resíduos A e C em uma proporção de 5:1 direcionou a síntese de polipeptídeos, e tanto a identidade como a quantidade de aminoácidos incorporados foram determinadas. Com base nas abundâncias relativas de resíduos A e C no RNA sintético, e atribuindo-se ao códon AAA (o códon mais provável) a frequência de 100, deveria haver três códons diferentes com a composição A₂C, cada qual com frequência relativa de 20; três com a composição AC₂, cada qual com frequência relativa de 4; e CCC com frequência relativa de 0,8. A atribuição de CCC foi baseada em informações obtidas em estudos prévios com poli(C). Onde duas atribuições experimentais são feitas, ambas são propostas para codificar o mesmo aminoácido.

^aEssas indicações da composição de nucleotídeos não contêm informação sobre a sequência nucleotídica (exceto, claro, AAA e CCC).

menos trincas ACC, CCA e CAC e muito poucas trincas CCC (Tabela 27-1). Utilizando uma grande variedade de mRNA artificiais sintetizados pela polinucleotídeo-fosforilase a partir de diferentes misturas de ADP, GDP, UDP e CDP, os grupos de Nirenberg e de Ochoa logo identificaram as composições de bases das trincas que codificam quase todos os aminoácidos. Apesar de esses experimentos revelarem a composição de bases das trincas codificadoras, eles não foram capazes de revelar a sequência das bases.

➤ **Convenção-chave:** grande parte da discussão a seguir trata de tRNA. O aminoácido especificado por um tRNA é indicado por um sobrescrito, como tRNA^{Ala}, e o tRNA aminoacilado é indicado por um nome com hífen: alanil-tRNA^{Ala} ou Ala-tRNA^{Ala}. ◀◀

Em 1964, Nirenberg e Philip Leder chegaram a outra grande descoberta experimental. Ribossomos isolados de *E. coli* se ligam a um aminoacil-tRNA específico na presença do polinucleotídeo mensageiro correspondente. Por exemplo, os ribossomos incubados com poli(U) e fenilalanil-tRNA^{Phe} (Phe-tRNA^{Phe}) se ligam a ambos os RNAs, mas, se incubados com poli(U) e algum outro aminoacil-tRNA, o aminoacil-tRNA não é ligado, uma vez que não reconhece as trincas UUU do poli(U) (Tabela 27-2). Mesmo trinucleotídeos eram capazes de promover a ligação específica de tRNA apropriados; portanto, esses experimentos podiam ser realizados com pequenos oligonucleotídeos sintetizados artificialmente. Com essa técnica, os pesquisadores determinaram quais aminoacil-tRNA se ligavam a 54 dos 64 códons possíveis. Para alguns códons, nenhum ou mais de um aminoacil-tRNA poderiam se ligar. Outro método foi necessário para completar e confirmar todo o código genético.

Por volta dessa época, uma abordagem complementar foi fornecida por H. Gobind Khorana, que desenvolveu métodos químicos para sintetizar polirribonucleotídeos com sequências repetidas de duas a quatro bases definidas. Os polipeptídeos produzidos a partir desses mRNA possuíam um ou poucos aminoácidos em padrões repetidos. Esses padrões, quando combinados com as informações obtidas a partir dos polímeros aleatórios utilizados por Nirenberg e colaboradores, permiti-



H. Gobind Khorana, 1922-2011
[Fonte: cortesia dos arquivos da University of Wisconsin-Madison.]

TABELA 27-2 Trinucleotídeos que induzem a ligação específica de aminoacil-tRNA aos ribossomos

Trinucleotídeo	Aumento relativo da ligação ao ribossomo de aminoacil-tRNA marcado com ¹⁴ C ^a		
	Phe-tRNA ^{Phe}	Lys-tRNA ^{Lys}	Pro-tRNA ^{Pro}
UUU	4,6	0	0
AAA	0	7,7	0
CCC	0	0	3,1

Fonte: informações de M. Nirenberg e P. Leder, *Science* 145:1399, 1964.

^aCada número representa o fator de aumento da quantidade de ¹⁴C ligado quando o trinucleotídeo indicado estava presente, em relação ao controle sem trinucleotídeo.



FIGURA 27-6 Efeito de um códon de término em um tetranucleotídeo repetitivo.

Códons de término (em cor salmão) são encontrados a cada quarto códon em três janelas de leitura diferentes (mostradas em cores diferentes). Dipeptídeos ou tripeptídeos são sintetizados, dependendo de onde o ribossomo se liga inicialmente.

ram determinar os códons sem ambiguidades. O copolímero $(AC)_n$, por exemplo, tem códons alternados ACA e CAC: ACACACACACACACA. O polipeptídeo sintetizado a partir desse mensageiro continha quantidades iguais de treonina e histidina. Considerando-se que um códon de histidina tem um A e dois C (Tabela 27-1), CAC deve codificar histidina, e ACA, treonina.

A consolidação dos resultados de muitos experimentos permitiu decifrar 61 dos 64 códons possíveis. Os outros três códons foram identificados como códons de término, em parte porque eles interrompiam os padrões de codificação de aminoácidos quando apareciam em um polímero sintético de RNA (**Figura 27-6**). Em 1966, já haviam sido estabelecidos os significados de todas as trinças de códons (organizados no quadro da **Figura 27-7**), as quais foram verificadas de muitas maneiras diferentes.

A decifração do código genético é considerada como uma das descobertas científicas mais importantes do século XX.

Os códons são a chave para a tradução da informação genética, direcionando a síntese de proteínas específicas. A fase de leitura é estabelecida quando a tradução de uma molécula de mRNA é iniciada e é mantida à medida que a maquinaria de síntese vai lendo a mensagem sequencialmente, de uma trinca a outra. Se a fase de leitura inicial estiver com uma ou duas bases desalinhadas, ou se a tradução, de alguma forma, pular um nucleotídeo no mRNA, todos os códons subsequentes ficarão fora de registro; o resultado, geralmente, é uma proteína “errada” com uma sequência de aminoácidos truncada.

Vários códons apresentam funções especiais (Figura 27-7). O **códon de iniciação** AUG é o sinal mais comum para o início de um polipeptídeo em todas as células, além de codificar resíduos Met nas posições internas dos polipeptídeos. Os **códons de terminação** (UAA, UAG e UGA), também denominados códons de parada ou códons sem sentido, geralmente sinalizam o fim da síntese de polipeptídeos e não codificam qualquer aminoácido conhecido. Algumas exceções a essas regras estão discutidas no Quadro 27-1.

Como será descrito na Seção 27.2, o início da síntese proteica na célula é um processo elaborado que depende dos códons de iniciação e de outros sinais no mRNA. Analisando retrospectivamente, os experimentos realizados por Nirenberg, Khorana e outros pesquisadores para identificar a função dos códons não deveriam ter funcionado, pois não havia códons de iniciação. De modo acidental, as condições experimentais permitiram que a síntese ocorresse sem que essas exigências normais de iniciação estivessem totalmente cumpridas. A diligência e o acaso levaram a uma descoberta importante – fato bastante comum na história da bioquímica.

Em uma sequência aleatória de nucleotídeos, um em cada 20 códons em cada fase de leitura é, em média, um códon de terminação. Em geral, uma fase de leitura que não apresente um códon de terminação entre 50 ou mais códons consecutivos é considerada uma **fase de leitura aberta (ORF)**, do inglês, *open reading frame*). Fases de leitura aberta longas geralmente correspondem a genes que codificam proteínas. Na análise de bancos de dados de sequências, programas sofisticados são utilizados para procurar por fases de leitura aberta, a fim de encontrar genes em meio a um imenso mar de DNA não gênico. Um gene ininterrupto que codifica uma proteína típica de massa molecular de 60.000 precisaria de uma fase de leitura aberta com 500 códons ou mais.

Uma característica intrigante do código genético é que um aminoácido pode ser codificado por mais de um códon, de modo que o código é considerado **degenerado**. Isso não significa que o código tenha falhas: apesar de um aminoácido possuir um ou mais códons, cada códon codifica apenas

Primeira letra do códon (extremidade 5')

Segunda letra do códon

	U	C	A	G
U	UUU Phe UUC Phe UUA Leu UUG Leu	UCU Ser UCC Ser UCA Ser UCG Ser	UAU Tyr UAC Tyr UAA Stop UAG Stop	UGU Cys UGC Cys UGA Stop UGG Trp
C	CUU Leu CUC Leu CUA Leu CUG Leu	CCU Pro CCC Pro CCA Pro CCG Pro	CAU His CAC His CAA Gln CAG Gln	CGU Arg CGC Arg CGA Arg CGG Arg
A	AUU Ile AUC Ile AUA Ile AUG Met	ACU Thr ACC Thr ACA Thr ACG Thr	AAU Asn AAC Asn AAA Lys AAG Lys	AGU Ser AGC Ser AGA Arg AGG Arg
G	GUU Val GUC Val GUA Val GUG Val	GCU Ala GCC Ala GCA Ala GCG Ala	GAU Asp GAC Asp GAA Glu GAG Glu	GGU Gly GGC Gly GGA Gly GGG Gly

FIGURA 27-7 “Dicionário” das palavras que codificam aminoácidos no mRNA. Os códons estão escritos na direção 5'→3'. A terceira base de cada códon (em negrito) desempenha um papel menor na especificação do aminoácido em relação às duas primeiras. Os três códons de término estão sombreados em cor salmão, e o códon de início AUG está em verde. Todos os aminoácidos, com exceção da metionina e do triptofano, têm mais de um códon. Na maioria dos casos, os códons que especificam o mesmo aminoácido diferem apenas na terceira base.

QUADRO 27-1 Exceções que confirmam a regra: variações naturais no código genético

Em bioquímica, bem como em outras disciplinas, exceções às regras gerais podem ser problemáticas para os professores e frustrantes para os alunos. Ao mesmo tempo, no entanto, elas ensinam que a vida é complexa e nos inspiram na busca por novas surpresas. Entender as exceções pode até mesmo reforçar a regra original de maneira surpreendente.

Seria de se esperar que o código genético tivesse poucas variações. Mesmo a substituição em um único aminoácido pode ter profundos efeitos danosos na estrutura de uma proteína. Ainda assim, ocorrem variações no código em alguns organismos, e estas são interessantes e instrutivas. Os tipos de variações e sua raridade fornecem fortes evidências de uma origem evolutiva comum para todos os seres vivos.

Para alterar o código, as mudanças devem ocorrer no(s) gene(s) que codifica(m) um ou mais tRNA, sendo o anticódon o alvo mais óbvio para a alteração. Essa mudança levaria a uma inserção sistemática de um aminoácido em um códon que, de acordo com o código-padrão (ver Figura 27-7), não é específico para aquele aminoácido. O código genético, na verdade, é definido por dois elementos: (1) os anticódons nos tRNA (que determinam onde um aminoácido é inserido em uma cadeia polipeptídica em crescimento) e (2) a especificidade das enzimas – as aminoacil-tRNA-sintetases, enzimas que catalisam a incorporação de aminoácidos nos tRNA, que determina a identidade do aminoácido ligado a determinado tRNA.

A maioria das mudanças repentinas no código teria efeitos catastróficos nas proteínas celulares; portanto, é mais provável que alterações no código persistiram onde relativamente poucas proteínas seriam afetadas, como genomas pequenos que codificam poucas proteínas. As consequências biológicas de uma mudança no código poderiam também ser reduzidas caso as mudanças acontecessem nos três códons de terminação, que geralmente não ocorrem *dentro* de genes (ver o Quadro 27-3 para as exceções a *essa* regra). Esse padrão é, de fato, observado.

Das pouquíssimas variações conhecidas no código genético, a maioria ocorre no DNA mitocondrial (mtDNA), o qual codifica apenas de 10 a 20 proteínas. As mitocôndrias têm seus próprios tRNA; portanto, as variações no seu código não afetam o genoma celular, que é muito maior. As mudanças mais comuns nas mitocôndrias envolvem códons de terminação. Essas mudanças afetam a terminação dos produtos de apenas um grupo de genes, e, às vezes, os efeitos são mínimos, pois os genes têm códons de terminação múltiplos (redundantes).

O mtDNA de vertebrados tem genes que codificam 13 proteínas, 2 rRNA e 22 tRNA (ver Figura 19-40). Dado o pequeno número de alterações nos códons, aliado a um

número incomum de regras variáveis (p. 1084), os 22 tRNA são suficientes para decodificar os genes que codificam para as proteínas, ao contrário dos 32 tRNA necessários para o código-padrão. Nas mitocôndrias, essas mudanças podem ser vistas como uma aerodinâmica genômica, pois um genoma menor confere uma vantagem na replicação para a organela. Quatro famílias de códons (nas quais o aminoácido é determinado pelos dois primeiros nucleotídeos) são decodificadas por um único tRNA com um resíduo U na primeira posição (oscilante) no anticódon. Ou o U pareia, de alguma forma, com qualquer uma das quatro possíveis bases na terceira posição do códon, ou um mecanismo do tipo “dois de três” é utilizado – ou seja, não é necessário haver pareamento de bases na terceira posição. Outros tRNA reconhecem códons com A ou G na terceira posição e ainda outros reconhecem U ou C, de modo que praticamente todos os tRNA reconhecem dois ou quatro códons.

No código-padrão, apenas dois aminoácidos são especificados por um único códon: metionina e triptofano (ver Tabela 27-3). Se todos os tRNA mitocondriais reconhecem dois códons, seria de se esperar códons adicionais para Met e Trp nas mitocôndrias. Foi verificado que a variação de códon mais comum é do códon UGA, normalmente um códon de terminação, que codifica para triptofano. O tRNA^{Trp} reconhece e insere um resíduo Trp tanto para o códon UGA como para o códon normal do Trp, UGG. A segunda variação mais comum é a conversão de AUA, de um códon que codifica Ile, para um códon que codifica Met; o códon normal para Met é AUG, e um único tRNA reconhece ambos os códons. As variações de código conhecidas nas mitocôndrias estão resumidas na Tabela Q-1.

Considerando as mudanças bem mais raras que ocorrem nos códigos de genomas celulares (para diferenciar dos genomas mitocondriais), constatou-se que a única variação em uma bactéria é, novamente, o uso de UGA para codificar resíduos Trp, o que ocorre no organismo unicelular de vida livre mais simples, o *Mycoplasma capricolum*. Entre os eucariotos, raras mudanças de códons extramitocondriais são observadas em algumas espécies de protistas ciliados, em que ambos os códons de terminação UAA e UAG podem especificar a glutamina. Também existem casos raros e interessantes nos quais códons de terminação foram adaptados para codificar aminoácidos que não estão entre os 20 aminoácidos-padrão, como detalhado no Quadro 27-2.

As mudanças no código não precisam ser absolutas; um códon nem sempre codifica um mesmo aminoácido. Por exemplo, em muitas bactérias – incluindo *E. coli* –, GUG (Val) é, às vezes, utilizado como códon de início que especifica Met. Isso ocorre apenas nos genes em que a se-

um aminoácido. A degeneração do código não é uniforme. Enquanto os aminoácidos metionina e triptofano possuem, cada um, apenas um códon, três aminoácidos (Arg, Leu, Ser), por exemplo, têm seis códons cada, cinco aminoácidos

têm quatro, a isoleucina tem três e nove aminoácidos têm dois códons (Tabela 27-3).

O código genético é quase universal. Com a exceção intrigante de algumas pequenas variações nas mitocôndrias,

TABELA Q-1 Variações do código conhecidas em mitocôndrias

	Códons ^a				
	UGA	AUA	AGA AGG	CUN	CGG
Códons (celulares) regulares	Término	Ile	Arg	Leu	Arg
Animais					
Vertebrados	Trp	Met	Terminação	+	+
<i>Drosophila</i>	Trp	Met	Ser	+	+
Leveduras					
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Trp	Met	+	Thr	+
<i>Torulopsis glabrata</i>	Trp	Met	+	Thr	?
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Trp	+	+	+	+
Fungos filamentosos	Trp	+	+	+	+
Tripanossomos	Trp	+	+	+	+
Plantas superiores	+	+	+	+	Trp
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	?	+	+	+	?

^aN indica qualquer um dos nucleotídeos; +, o códon tem o mesmo significado que no códon regular; ?, o códon não é observado neste genoma mitocondrial.

quência GUG está apropriadamente localizada em relação a sequências específicas de mRNA que afetam o início da tradução (como discutido na Seção 27.2).

A alteração mais surpreendente do código genético ocorre em algumas espécies de fungos do gênero *Candida*, como descoberto originalmente em *Candida albicans*. *C. albicans* é um organismo com alta complexidade genômica, e, ainda assim, o seu código genético sofreu uma mudança significativa: o códon CUG, que normalmente codifica Leu, codifica Ser nesse organismo. A pressão da seleção natural para essa mudança é completamente desconhecida. Além disso, as estruturas químicas de Ser e Leu são bem diferentes. Entretanto, até mesmo essa mudança pode ser compreendida com base nas propriedades de um código universal. Quando vários códons codificam para um mesmo aminoácido e usam vários tRNA, nem todos os códons são utilizados com a mesma frequência. Em um fenômeno denominado **viés de códon**, alguns códons que codificam um determinado aminoácido são utilizados mais frequentemente (às vezes com uma frequência muito maior) do que outros códons. Os tRNA para os códons mais utilizados geralmente estão presentes em maior concentração do que os tRNA para códons menos usados. A degeneração de códons leva à existência de seis códons para Leu. Em bactérias, CUG geralmente codifica Leu. No entanto, em fungos de gêneros muito próximos a *Candida*, mas que não têm alterações nos códons, o códon CUG

é usado raramente para codificar Leu e geralmente está ausente em proteínas que são altamente expressas. Uma mudança no código CUG teria, assim, um efeito muito menor no metabolismo celular de fungos do que se todos os códons fossem usados com a mesma frequência. A mudança no código pode ter ocorrido a partir de uma perda gradual dos códons CUG em genes e do tRNA que reconhece CUG como um códon de Leu, seguido por um evento de captura – uma mutação no anticódon de um tRNA^{Ser} que permitiu que este reconhecesse CUG. De modo alternativo, pode ter havido um estágio intermediário, no qual CUG seria reconhecido como códon codificador tanto de Leu como de Ser, talvez com sinais específicos nos mRNA que ajudassem um ou outro tRNA a reconhecerem códons CUG específicos (ver Quadro 27-2). A análise filogenética indica que a redefinição de CUG como um códon de Ser ocorreu nos ancestrais de *Candida* há cerca de 150 a 170 milhões de anos.

Essas variações nos mostram que o código não é tão universal como outrora se pensava, mas que sua flexibilidade é rigorosamente restrita. As variações são, obviamente, derivadas do código normal, e nunca se encontrou um exemplo sequer de um código totalmente diferente. O limite de variações no código fortalece o princípio de que todas as formas de vida nesse planeta evoluíram com base em apenas um único (e levemente flexível) código genético.

algumas bactérias e alguns eucariotos unicelulares (Quadro 27-1), os códons dos aminoácidos são idênticos em todas as espécies estudadas até agora. Os seres humanos, *E. coli*, a planta do tabaco, anfíbios e vírus compartilham do mesmo

código genético. Isso sugere que todas as formas de vida têm um ancestral evolutivo comum, cujo código genético foi preservado ao longo da evolução biológica. Até mesmo as variações reforçam esse tema.

TABELA 27-3 A degeneração do código genético

Aminoácido	Número de códons	Aminoácido	Número de códons
Met	1	Tyr	2
Trp	1	Ile	3
Asn	2	Ala	4
Asp	2	Gly	4
Cys	2	Pro	4
Gln	2	Thr	4
Glu	2	Val	4
His	2	Arg	6
Lys	2	Leu	6
Phe	2	Ser	6

A oscilação permite que alguns tRNA reconheçam mais de um códon

Quando vários códons diferentes especificam um mesmo aminoácido, a diferença entre eles geralmente se dá na terceira base (na extremidade 3'). Por exemplo, a alanina é codificada pelas trinças GCU, GCC, GCA e GCG. Os códons da maioria dos aminoácidos podem ser simbolizados por XY_G^A ou por XY_G^U . As duas primeiras letras de cada códon são os determinantes primários da especificidade, uma característica que apresenta algumas consequências interessantes.

Os RNA transportadores pareiam com códons do mRNA em uma sequência de três bases nos tRNA, denominadas **anticódon**. A primeira base do códon no mRNA (lido na direção 5'→3') pareia com a terceira base do anticódon (**Figura 27-8a**). Se a trinca do anticódon de um tRNA reconhecesse apenas uma trinca de códon no pareamento de bases de Watson-Crick, em todas as três posições, as células teriam um tRNA para cada códon de aminoácido. Entretanto, esse não é o caso, pois os anticódons de alguns tRNA incluem o nucleotídeo inosinato (abreviado como I), o qual contém uma base incomum, a hipoxantina (ver Figura 8-5b). O inosinato pode formar ligações de hidrogênio com três nucleotídeos diferentes (U, C e A; Figura 27-8b), embora esses pareamentos sejam muito mais fracos do que as ligações de hidrogênio dos pares de Watson e Crick $G \equiv C$ e $A = U$. Em leveduras, um tRNA^{Arg} tem o anticódon (5')ICG, o qual reconhece três códons de arginina: (5')CGA, (5')CGU e (5')CGC. As duas primeiras bases são idênticas (CG) e formam pares de bases de Watson-Crick fortes com as bases correspondentes do anticódon, mas a terceira base (A, U ou C) forma ligações de hidrogênio mais fracas com o resíduo I na primeira posição do anticódon.

A análise desse e de outros pareamentos códon-anticódon levou Crick a concluir que a terceira base da maioria dos códons pareia de maneira mais frouxa com a base correspondente do anticódon; a terceira base desses códons (e a primeira base dos seus anticódons correspondentes) “os-

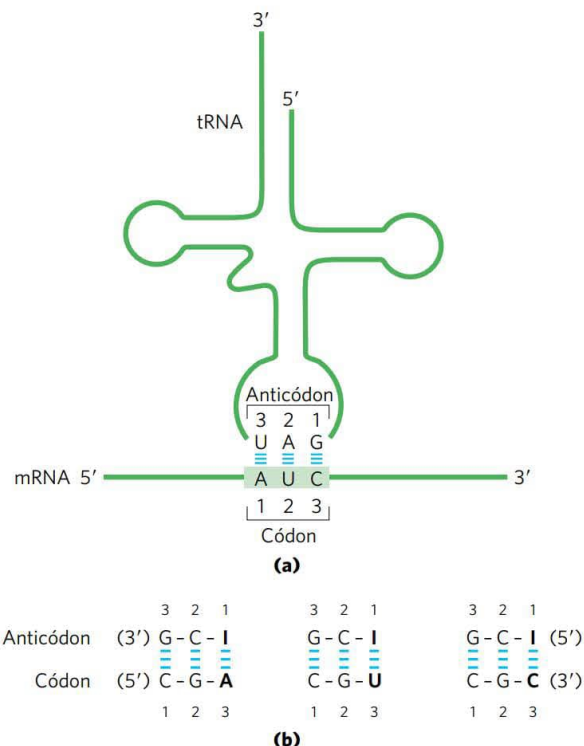


FIGURA 27-8 Pareamento entre códon e anticódon. **(a)** O alinhamento entre os dois RNA é antiparalelo. O tRNA está mostrado na configuração tradicional de folha de trevo. **(b)** Quando o anticódon do tRNA contém inosinato, são possíveis três pareamentos diferentes com o códon.

cila”. Crick propôs uma série de quatro relações, chamada de **hipótese da oscilação**:

1. As duas primeiras bases de um códon no mRNA sempre estabelecem pareamentos fortes de bases do tipo Watson-Crick com as bases correspondentes no anticódon do tRNA e conferem a maior parte da especificidade do código.
2. A primeira base do anticódon (lendo na direção 5'→3'; essa base pareia com a terceira base do códon) determina o número de códons reconhecidos pelo tRNA. Quando a primeira base do anticódon é C ou A, o pareamento de bases é específico, e apenas um códon é reconhecido por aquele tRNA. Quando a primeira base é U ou G, a ligação é menos específica, e dois códons diferentes podem ser lidos. Quando inosina (I) é o primeiro nucleotídeo (oscilante) de um anticódon, três códons diferentes podem ser reconhecidos – o número máximo para qualquer tRNA. Essas relações estão resumidas na Tabela 27-4.
3. Quando um aminoácido é especificado por diversos códons diferentes, os códons que diferem em uma das duas primeiras bases necessitam de tRNA diferentes.
4. Um mínimo de 32 tRNA são necessários para traduzir todos os 61 códons (31 para codificar os aminoácidos e 1 para o início da tradução).

TABELA 27-4 Como a base oscilante do anticódon determina o número de códons que um tRNA pode reconhecer

1. Reconhecimento de um códon:	
Anticódon	(3') X-Y- C (5') (3') X-Y- A (5')
Códon	(5') X'-Y'- G (3') (5') X'-Y'- U (3')
2. Reconhecimento de dois códons:	
Anticódon	(3') X-Y- U (5') (3') X-Y- G (5')
Códon	(5') X'-Y'- A (3') (5') X'-Y'- C (3')
3. Reconhecimento de três códons:	
Anticódon	(3') X-Y- I (5')
Códon	(5') X'-Y'- A (3')

Nota: X e Y indicam bases complementares e capazes de forte pareamento de Watson e Crick com X' e Y', respectivamente. As bases oscilantes, na posição 3' dos códons e 5' dos anticódon, estão sombreadas em branco.

A base oscilante (ou terceira base) do códon contribui para a especificidade, porém, como ela pareia de forma frouxa com a base correspondente no anticódon, ela permite uma dissociação rápida entre o tRNA e o códon durante a síntese proteica. Se todas as três bases de um códon se envolvessem em fortes pareamentos de Watson e Crick com as três bases do anticódon, os tRNA se dissociariam muito lentamente, o que limitaria a velocidade da síntese proteica. As interações códon-anticódon permitem um equilíbrio entre precisão e velocidade.

O código genético é resistente a mutações

O código genético exerce um papel interessante na proteção da integridade genômica de todo organismo vivo. A evolução não produziu um código no qual a especificidade de cada códon tivesse surgido ao acaso. Em vez disso, o código é extremamente resistente aos efeitos danosos dos tipos mais comuns de mutações – as **mutações de troca de sentido** ou “*missense*”, nas quais um simples par de bases substitui outro. Na terceira posição do códon, que é a base oscilante, substituições de uma única base causam uma mudança no aminoácido codificado em apenas 25% dos casos. Portanto, a maioria dessas alterações são **mutações silenciosas**, nas quais o nucleotídeo é diferente, mas o aminoácido codificado permanece o mesmo.

Devido aos tipos de danos espontâneos no DNA que afetam os genomas (ver Capítulo 8) a mutação de troca de sentido mais frequente é a **mutação de transição**, na qual uma purina é substituída por outra purina ou uma pirimidina é substituída por outra pirimidina (p. ex., G=C é trocado para A=T). Todas as três posições de um códon evoluíram, de forma que existe certa resistência a mutações de transição. Uma mutação na primeira posição do códon normalmente produz uma mudança no aminoácido que é codificado, mas essa mudança geralmente leva à troca por um aminoácido com propriedades químicas semelhantes. Isso é fato, principalmente para os aminoácidos hidrofóbicos, que predominam na primeira coluna do código mostrado na Figura 27-7. Considere o códon GUU para Val. Uma alteração para AUU substituiria Val por Ile. Uma alteração para CUU substituiria Val por Leu. As mudanças resultantes na estrutura e/ou na função da proteína codificada por aquele gene seriam geralmente (mas nem sempre) pequenas.

Estudos computacionais mostraram que códigos genéticos delineados ao acaso são quase sempre menos resistentes a mutações do que o código genético existente. Os resultados indicam que o código sofreu um processo de simplificação antes do aparecimento de LUCA, a célula ancestral.

O código genético nos mostra como a informação para a síntese proteica é armazenada nos ácidos nucleicos e fornece algumas pistas de como essa informação é traduzida em proteínas.

Mudanças na fase da tradução e edição do RNA afetam a maneira como o código é lido

Uma vez estabelecido o quadro de leitura durante a síntese proteica, os códons são traduzidos sem haver sobreposição ou parada até que o complexo ribossômico encontre um códon de término. Os outros dois quadros de leitura possíveis geralmente não contêm informação genética útil, mas alguns genes são estruturados de tal forma que os ribossomos “soluçam” em um determinado ponto durante a tradução dos respectivos mRNA, mudando o quadro de leitura daquele ponto em diante. Esse parece ser um mecanismo para permitir que duas ou mais proteínas relacionadas, porém diferentes, possam ser produzidas a partir de um único transcrito, ou para regular a síntese de uma proteína.

Um dos exemplos mais bem documentados de **mudança de fase de tradução** ocorre durante a tradução do mRNA dos genes sobrepostos *gag* e *pol* do vírus do sarcoma de Rous (ver Figura 26-34). A fase de leitura para *pol* é deslocada para a esquerda em um par de bases (fase de leitura -1) em relação à fase de leitura para *gag* (Figura 27-9).

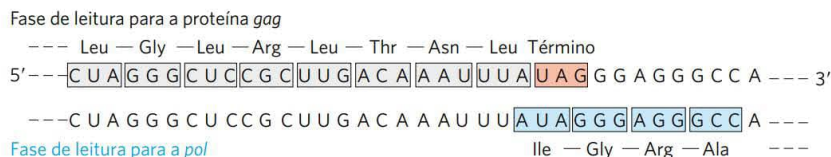


FIGURA 27-9 Mudança de fase de leitura para a tradução em um transcrito de retrovírus. A figura mostra a região de sobreposição *gag-pol* no RNA do vírus do sarcoma de Rous.

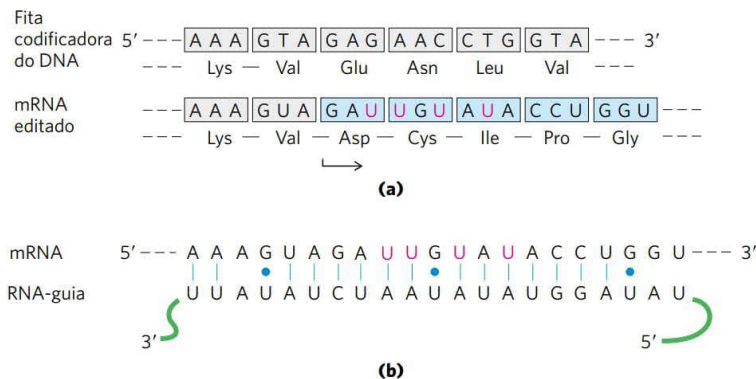


FIGURA 27-10 Edição do RNA do transcrito do gene da subunidade II da citocromo-oxidase das mitocôndrias de *Trypanosoma brucei*. **(a)** A inserção de quatro resíduos U (em cor-de-rosa) produz um quadro de leitura revisada. **(b)** Uma classe especial de RNA-guias, complementares ao produto editado, age como molde para o processo de edição. Observe a presença de três pares de base G=U, indicados por pontos azuis para indicar pareamento de Watson-Crick.

O produto do gene *pol* (a transcriptase reversa) é traduzido como uma poliproteína grande, a partir do mesmo mRNA que é usado para a proteína *gag* sozinha (ver Figura 26-33). A poliproteína, ou proteína *gag-pol*, é, então, clivada por digestão proteolítica para originar a transcriptase reversa madura. A produção da poliproteína requer uma mudança de quadro de leitura durante a tradução na região de sobreposição para permitir que o ribossomo contorne o códon de término UAG no final do gene *gag* (sombreado em vermelho-claro na Figura 27-9).

Mudanças de fase de leitura ocorrem em cerca de 5% das traduções desse mRNA, de modo que a poliproteína *gag-pol* (e, depois, a transcriptase reversa) é sintetizada com uma frequência que corresponde a cerca de um vigésimo daquela da proteína *gag*, nível suficiente para que o vírus se reproduza com eficiência. Em alguns retrovírus, outra mudança de fase de leitura permite a tradução de uma poliproteína ainda maior, que inclui o produto do gene *env* fundido aos produtos dos genes *gag* e *pol* (ver Figura 26-33). Um mecanismo semelhante está envolvido na produção das subunidades τ e γ da DNA-polimerase III de *E. coli* a partir de um único transcrito do gene *dnaX* (ver nota de rodapé da Tabela 25-2).

Alguns mRNA são editados antes da tradução. A **edição do RNA** pode envolver adição, deleção ou alteração de nucleotídeos no RNA, de modo a afetar o significado do transcrito quando ele é traduzido. A adição ou a deleção de nucleotídeos é mais comumente observada em RNA provenientes dos genomas de mitocôndrias e cloroplastos de eucariotos. Essas reações necessitam de uma classe especial de moléculas de RNA codificadas por essas mesmas organelas, com sequências complementares aos mRNA a serem editados. Esses RNA-guias (gRNA; **Figura 27-10**) agem como moldes para o processo de edição.

Os transcritos iniciais dos genes que codificam a subunidade II da citocromo-oxidase nas mitocôndrias de alguns protistas fornecem um exemplo de edição por inserção. Esses transcritos não correspondem precisamente às sequências necessárias na extremidade carboxila do produto proteico. Um processo de edição pós-transcricional insere quatro resíduos U que alteram a fase de leitura do transcrito. A Figura 27-10 mostra os resíduos U adicionados na pequena porção do transcrito que é afetada pela edição. Observe que o pareamento de bases entre o transcrito inicial e o RNA-guia inclui vários pares de base G=U (pontos azuis), os quais são muito comuns em moléculas de RNA.

A edição de RNA por alteração de nucleotídeos envolve, na maioria das vezes, a desaminação enzimática de resíduos de adenosina ou de citidina, formando inosina ou uridina, respectivamente (**Figura 27-11**), mas outras alterações de base também foram descritas. A inosina é interpretada como um resíduo G durante a tradução. As reações de desaminação da adenosina são realizadas por adenosina-desaminases que agem sobre o RNA (**ADAR**). As desaminações da citidina são realizadas por uma família de enzimas formada pelos peptídeos catalíticos de edição do mRNA da apoB (**APOBEC**, do inglês, *apoB mRNA editing catalytic peptide*), a qual inclui enzimas que induzem a ativação das desaminases (**AID**, do inglês, *activation-induced deaminase*). Ambos os grupos ADAR e APOBEC de enzimas desaminases possuem um domínio catalítico coordenado por zinco homólogo.

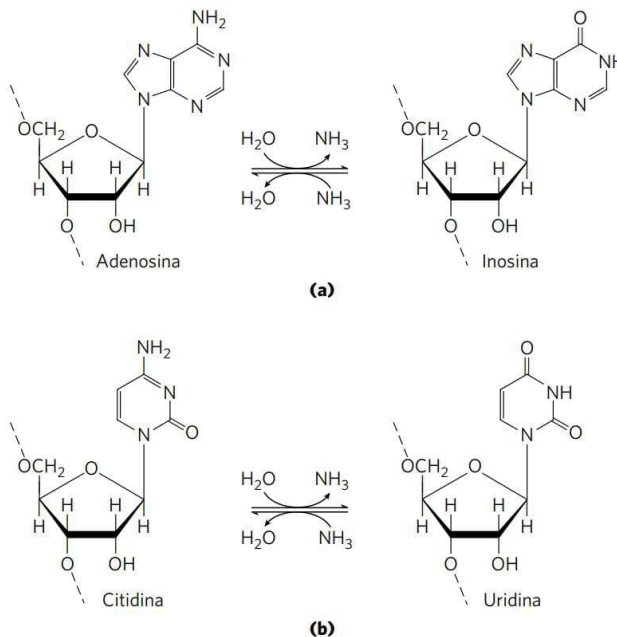


FIGURA 27-11 Reações de desaminação que resultam em edição do RNA. **(a)** A conversão de nucleotídeos de adenosina em nucleotídeos de inosina é catalisada por enzimas ADAR. **(b)** A conversão de citidina em uridina é catalisada pelas enzimas da família APOBEC.

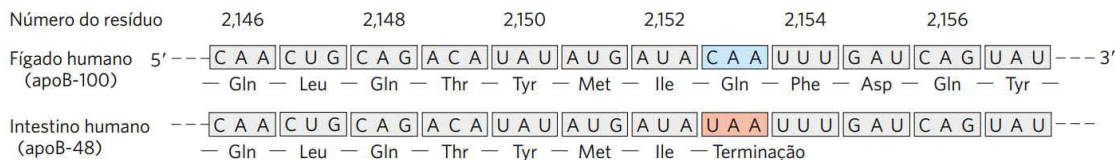


FIGURA 27-12 Edição do RNA do transcrito do gene do componente apoB-100 da LDL. A desaminação, que ocorre apenas no intestino, converte uma citidina específica em uridina, trocando um códon para a Gln por um códon de término, produzindo uma proteína truncada.

A edição de A para I realizada pela ADAR nos transcritos de RNA é particularmente comum nos primatas. A maior parte da edição ocorre nos elementos Alu, um subconjunto de elementos intercalados pequenos (SINE), transposons de eucariotos que são muito comuns nos genomas de mamíferos. O DNA humano contém mais de um milhão de elementos Alu de 300 pb, perfazendo até 10% do genoma. Esses elementos estão concentrados próximos a genes que codificam proteínas, geralmente em íntrons e regiões que não são traduzidas nas extremidades 3' e 5' dos transcritos. Logo que são sintetizados (antes do processamento), os mRNA humanos possuem *em média* de 10 a 20 elementos Alu. Certos microRNA também são alvos de ADAR. Alterações no miRNA geralmente reduzem a expressão e/ou a função.

As enzimas ADAR se ligam e realizam a edição de A para I apenas em regiões de dupla-fita do RNA. A abundância de elementos Alu possibilita muitas oportunidades para pareamentos de bases intramoleculares nos transcritos, fornecendo as dupla-fitas necessárias para as ADAR. Algumas edições afetam as sequências codificadoras dos genes. Defeitos na função de ADAR têm sido associados a várias condições neurológicas em seres humanos, incluindo esclerose lateral amiotrófica (ELA), epilepsia e depressão profunda.

Os genomas dos vertebrados são repletos de SINE e muitos tipos diferentes de SINE estão presentes na maioria desses organismos. Os elementos Alu predominam apenas nos primatas. Uma análise cuidadosa de genes e de transcritos indica que a edição de A para I é de 30 a 40 vezes mais prevalente nos seres humanos do que em camundongos, em grande parte devido à presença de muitos elementos Alu. A edição de A para I em grande escala e um nível aumentado de *splicing* alternativo (ver Figura 26-19b) são duas características que diferenciam os genomas de primatas dos genomas de outros mamíferos. Ainda não está claro se essas reações são casuais ou se elas tiveram papéis-chave na evolução dos primatas e, posteriormente, do ser humano.

Existem seis classes gerais de citidina-desaminases APOBEC: APOBEC1-5 e AID. A maioria dessas enzimas age sobre o DNA. As proteínas AID agem aumentando a diversidade de anticorpos durante a maturação do gene da imunoglobulina (ver Figuras 25-43 e 25-44). As proteínas APOBEC têm uma ampla gama de funções, incluindo a supressão da expressão gênica patogênica de retrovírus e retrotransposons, e papéis na imunidade inata. A APOBEC1 e algumas proteínas APOBEC3 (o genoma humano codifica para sete parálogos de APOBEC) fazem edição de mRNA. Um exemplo de edição de RNA bem estudado por desaminação mediada por APOBEC1 ocorre no gene para o componente da lipoproteína de baixa densidade de vertebrados,

a apolipoproteína B. Uma forma de apolipoproteína B, a apoB-100 (M_r 513.000), é sintetizada no fígado; uma outra forma, a apoB-48 (M_r 250.000), é sintetizada no intestino. Ambas são codificadas por um mRNA produzido a partir do gene da apoB-100. Uma citidina-desaminase APOBEC, encontrada apenas no intestino, liga-se ao mRNA no códon 2.153 (CAA, correspondente ao resíduo de aminoácido Gln) e converte o C para um U, originando o códon de término UAA. A apoB-48 produzida no intestino a partir desse mRNA modificado é simplesmente uma forma encurtada (correspondente à metade aminoterminal) da apoB-100 (Figura 27-12). Essa reação permite a síntese tecido-específica de duas proteínas diferentes a partir de um único gene.

As funções das APOBEC 2, 4 e 5 são pouco conhecidas. Entretanto, sua capacidade de causar mutações no genoma pode torná-las uma responsabilidade para a célula. Uma ou mais enzimas APOBEC são frequentemente superexpressas em células tumorais, e sua capacidade mutagênica pode contribuir para a formação de tumores. Elas também fornecem um mecanismo para a introdução de mutações múltiplas em segmentos-alvo do cromossomo, levando a uma evolução seletiva e mais rápida dessas regiões do DNA.

RESUMO 27.1 O código genético

- A sequência específica de aminoácidos de uma proteína é construída ao longo da tradução da informação contida no mRNA. Esse processo é realizado pelos ribossomos.
- Os aminoácidos são especificados pelos códons do mRNA, os quais consistem em trincas de nucleotídeos. A tradução requer moléculas adaptadoras, os tRNA, que reconhecem os códons e inserem os aminoácidos segundo uma sequência específica no polipeptídeo.
- As sequências das bases dos códons foram deduzidas a partir de experimentos empregando mRNA sintéticos de composição e sequência conhecidas.
- O códon AUG sinaliza o início da tradução. As trincas UAA, UAG e UGA sinalizam a terminação da síntese.
- O código genético é degenerado: ele tem vários códons para a maioria dos aminoácidos.
- O código genético padrão é universal em todas as espécies, apresenta apenas pequenas alterações nas mitocôndrias e em alguns organismos unicelulares. As variações ocorrem em padrões que reforçam o conceito de um código universal.
- A terceira posição em cada códon é bem menos específica do que a primeira e a segunda, e é chamada de oscilante.

- O código genético é resistente aos efeitos das mutações de troca do sentido.
- A mudança de fase de leitura da tradução e a edição do RNA afetam a maneira como o código genético é lido durante a tradução.
- A edição de RNA pelas ADAR (adenosina-desaminases) e APOBEC (citidina-desaminases) também altera a sequência codificada por alguns mRNA. Muitas enzimas APOBEC têm o DNA como alvo, onde elas agem facilitando a diversidade dos anticorpos e a supressão de retrovírus e retrotransposons.

27.2 Síntese proteica

Como foi visto para o DNA e o RNA (Capítulos 25 e 26), a síntese de biomoléculas poliméricas pode ser considerada como consistindo nos estágios de início (ou iniciação), alongamento e término (ou terminação). Em geral, esses processos fundamentais são acompanhados de mais dois estágios: a ativação de precursores, anterior à síntese, e o processamento pós-sintético do polímero completo. A sín-

tese proteica segue o mesmo padrão. A ativação dos aminoácidos antes de sua incorporação nos polipeptídeos e o processamento pós-traducional do polipeptídeo completo desempenham papéis particularmente importantes em garantir tanto a fidelidade da síntese quanto a função adequada do produto proteico. O processo está esquematizado na **Figura 27-13**. Os elementos celulares que participam dos cinco estágios da síntese proteica em *E. coli* e em outras bactérias estão listados na Tabela 27-5; as necessidades das células eucarióticas são semelhantes, embora geralmente o número de elementos seja maior. Um panorama inicial dos estágios da síntese proteica serve de esboço útil para a discussão que segue.

A biossíntese de proteínas ocorre em cinco estágios

Etapa 1: ativação de aminoácidos Para a síntese de um polipeptídeo de sequência definida, duas necessidades químicas precisam ser satisfeitas: (1) o grupamento carboxila de cada aminoácido deve ser ativado para facilitar a formação da ligação peptídica, e (2) um elo deve ser estabelecido entre cada novo aminoácido e a informação contida no mRNA

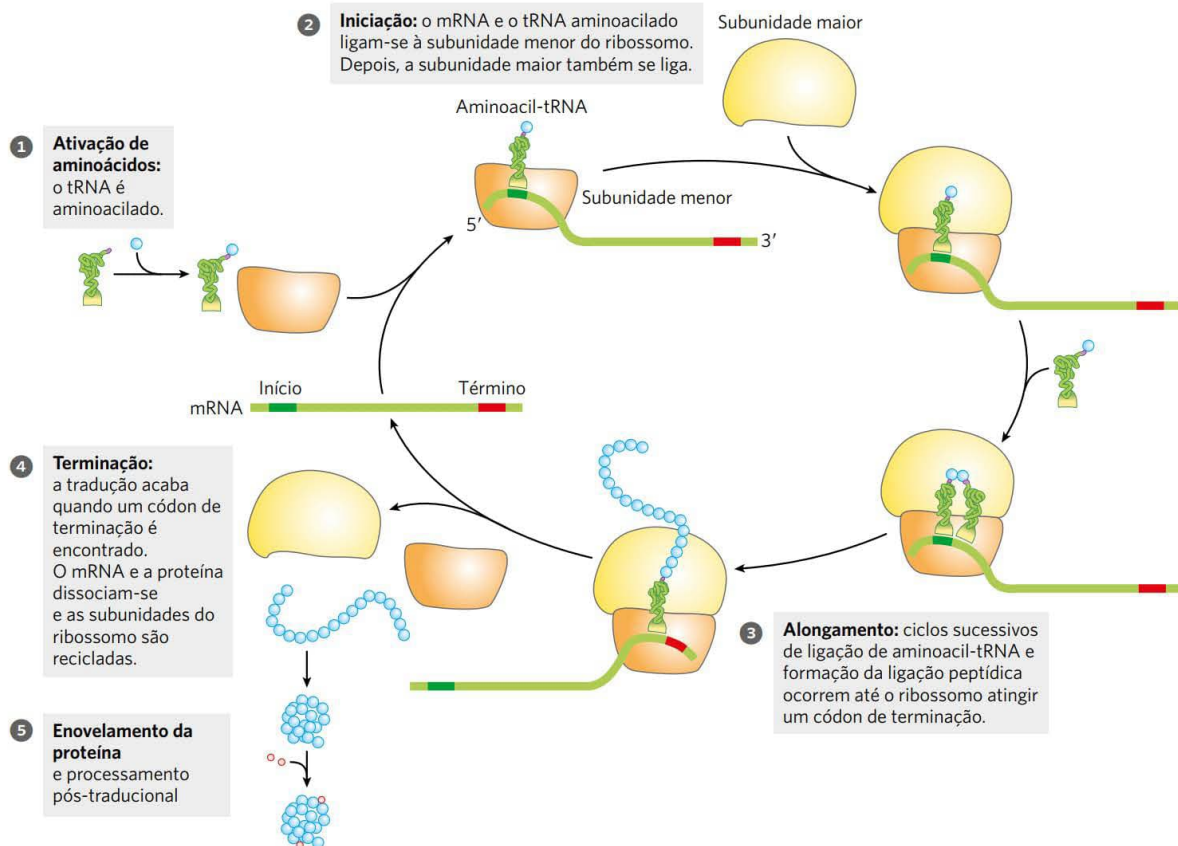


FIGURA 27-13 Visão geral dos cinco estágios da síntese proteica. 1 Os tRNA são aminoacilados. 2 A tradução é iniciada quando um mRNA e um tRNA aminoacilado se ligam a um ribossomo. 3 Durante o alongamento, o ribossomo se move ao longo do mRNA, combinando os tRNA com cada códon e catalisando a formação da ligação peptídica. 4 A tradução termina em um códon de terminação, e as subunidades do ribossomo são liberadas e recicladas para um novo ciclo de síntese proteica. 5 Após ser sintetizada, a proteína precisa ser enovelada para atingir a sua conformação ativa, e os componentes dos ribossomos são reciclados. A maioria das proteínas são processadas após terem sido sintetizadas. Alguns aminoácidos podem ser removidos, outros podem sofrer centenas de modificações químicas conhecidas.

TABELA 27-5 Componentes necessários para os cinco principais estágios da síntese proteica em *E. coli*

Estágio	Componentes essenciais
1. Ativação de aminoácidos	20 aminoácidos 20 aminoacil-tRNA-sintetases 32 ou mais tRNA ATP Mg ²⁺
2. Iniciação	mRNA N-Formilmetionil-tRNA ^{Met} Códon de início no mRNA (AUG) Subunidade ribossômica 30S Subunidade ribossômica 50S Fatores de iniciação (IF1, IF2, IF3) GTP Mg ²⁺
3. Alongamento	Ribossomo 70S funcional (complexo de iniciação) Aminoacil-tRNA especificados pelos códons Fatores de alongamento (EF-Tu, EF-Ts, EF-G) GTP Mg ²⁺
4. Terminação e reciclagem dos ribossomos	Códon de término no mRNA Fatores de liberação (RF1, RF2, RF3, RRF) EF-G IF3
5. Enovelamento e processamento pós-traducional	Chaperonas e enzimas envolvidas no enovelamento de proteínas (PPI, PDI); componentes para remoção de resíduos iniciadores e sequências sinalizadoras, processamento proteolítico adicional, modificação de resíduos terminais e ligação de grupos acetila, fosforila, metila, carboxila, de carboidratos e de grupos prostéticos

que o codifica. Ambas as exigências são atingidas quando o aminoácido se liga a um tRNA no primeiro estágio da síntese proteica. A ligação do aminoácido certo ao tRNA certo é fundamental nesse processo. Essa reação ocorre no citosol, e não no ribossomo. Cada um dos 20 aminoácidos é ligado covalentemente a um tRNA específico às custas da energia do ATP, utilizando enzimas ativadoras dependentes de Mg²⁺, conhecidas como aminoacil-tRNA-sintetases. Quando ligados aos seus aminoácidos (aminoacilados), os tRNA são considerados “carregados”.

Etapa 2: iniciação O mRNA contendo o código para a síntese do polipeptídeo se liga à subunidade menor do ribossomo e ao aminoacil-tRNA iniciador. A subunidade ribossômica maior se liga, então, para formar um complexo de iniciação. O aminoacil-tRNA iniciador estabelece um pareamento de bases com o códon AUG do mRNA, que sinaliza o começo do polipeptídeo. Esse processo, que requer GTP, é promovido por proteínas citosólicas, denominadas fatores de iniciação.

Etapa 3: alongamento O polipeptídeo nascente é alongado pela adição de unidades sucessivas de aminoácidos, as quais são ligadas covalentemente após serem levadas até o ribossomo e posicionadas corretamente pelo respectivo tRNA, que, por sua vez, realiza um pareamento de bases com o códon correspondente no mRNA. O alongamento requer pro-

teínas citosólicas, conhecidas como fatores de alongamento. A ligação de cada aminoacil-tRNA que entra e o movimento do ribossomo ao longo do mRNA são facilitados pela hidrólise de GTP à medida que cada resíduo de aminoácido é adicionado ao polipeptídeo nascente.

Etapa 4: terminação e reciclagem do ribossomo O término da cadeia polipeptídica é sinalizado por um códon de terminação no mRNA. O novo polipeptídeo é liberado do ribossomo, auxiliado por proteínas denominadas fatores de liberação, e o ribossomo é reciclado para um novo ciclo de síntese.

Etapa 5: enovelamento e processamento pós-traducional Para chegar até a sua forma biologicamente ativa, o novo polipeptídeo deve se enovelar na sua conformação tridimensional apropriada. Antes ou depois de se enovelar, o novo polipeptídeo pode sofrer processamento enzimático, incluindo remoção de um ou mais aminoácidos (geralmente da extremidade aminoterminal); adição de grupamentos acetila, fosforila, metila, carboxila ou outros grupos a determinados resíduos de aminoácidos; clivagem proteolítica e/ou ligação de oligossacarídeos ou grupos prostéticos.

Antes de se considerar detalhadamente esses cinco estágios, é preciso examinar dois componentes-chave na biossíntese de proteínas: os ribossomos e os tRNA.

TABELA 27-6 RNA e proteínas que compõem os ribossomos de *E. coli*

Subunidade	Número de proteínas diferentes	Número total de proteínas	Denominação das proteínas	Número e tipos de rRNA
30S	21	21	S1–S21	1 (rRNA 16S)
50S	33	36	L1–L36 ^a	2 (rRNA 5S e 23S)

^aAs denominações L1 a L36 não correspondem a 36 proteínas diferentes. A proteína originalmente chamada de L7 é, na verdade, uma forma modificada da L12, e L8 é um complexo formado por três outras proteínas. Além disso, constatou-se que L26 é a mesma proteína que S20 (e não parte da subunidade 50S). Dessa forma, a subunidade maior é constituída por 33 proteínas diferentes. Existem quatro cópias da proteína L7/L12, perfazendo 36 proteínas no total.

O ribossomo é uma máquina supramolecular complexa

Cada célula de *E. coli* contém 15 mil ribossomos ou mais, o que compreende quase um quarto da massa seca da célula. Os ribossomos das bactérias contêm cerca de 65% de rRNA e 35% de proteína; eles têm um diâmetro de aproximadamente 18 nm e são compostos de duas subunidades diferentes, com coeficientes de sedimentação de 30S e 50S e um coeficiente de sedimentação combinado de 70S. Ambas as subunidades contêm dezenas de proteínas ribossômicas (proteínas r) e ao menos um grande rRNA (Tabela 27-6).

Após a descoberta de Zamecnik de que os ribossomos são os complexos responsáveis pela síntese proteica e após a elucidação do código genético, o estudo dos ribossomos acelerou. No final da década de 1960, Masayasu Nomura e colaboradores demonstraram que as duas subunidades ribossômicas podem ser separadas em RNA e proteínas que as compõem e, depois, reconstituídas *in vitro*. Sob condições experimentais apropriadas, o RNA e as proteínas se reorganizam espontaneamente para formar as subunidades 30S e 50S, quase que de forma idêntica em estrutura e atividade às subunidades nativas. Essa descoberta importante incentivou décadas de pesquisa acerca da estrutura e da função das proteínas e dos RNA ribossômicos. Ao mesmo tempo, métodos estruturais cada vez mais sofisticados revelaram mais e mais detalhes da estrutura dos ribossomos.

Com a chegada do novo milênio, foram elucidadas as primeiras estruturas obtidas em alta resolução de subuni-



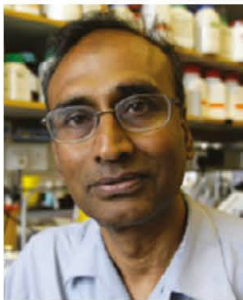
Masayasu Nomura,
1927–2011
[Fonte: cortesia dos
arquivos da University
of Wisconsin-Madison.]

dades de ribossomo de bactéria, por Venki Ramakrishnan, Thomas Steitz, Ada Yonath, Harry Noller e outros. Esse trabalho proporcionou várias surpresas (**Figura 27-14a**). Em primeiro lugar, mudou o foco tradicional, que dava maior importância às proteínas que compõem os ribossomos. As subunidades ribossômicas são moléculas de RNA imensas. Na subunidade 50S, os rRNA 5S e 23S formam o cerne da estrutura. As proteínas são elementos secundários no complexo, compondo a superfície. Em segundo lugar, e mais importante, não existe proteína no espaço de 18 Å do sítio ativo onde há a formação da ligação peptídica. Assim, a estrutura em alta resolução confirma o que Harry Noller havia predito anos antes: o ribossomo é uma ribozima. Além do conhecimento que as estruturas detalhadas dos ribossomos e suas subunidades fornecem sobre o mecanismo da síntese proteica (descrito a seguir), esses achados estimularam uma nova visão sobre a evolução da vida (Seção 26.3). Os ribossomos das células eucarióticas também foram, por fim, submetidos à análise estrutural (Figura 27-14b).

O ribossomo bacteriano é complexo, com um peso molecular combinado de aproximadamente 2,7 milhões. As duas subunidades dos ribossomos, com formatos irregulares, encaixam-se de modo a formar uma fenda, pela qual o mRNA passa à medida que o ribossomo se desloca ao longo dele durante a tradução (Figura 27-14a). As 57 proteínas nos ribossomos bacterianos variam significativamente em tamanho e estrutura. Os pesos moleculares variam de cerca de 6.000 a 75.000. A maioria das proteínas tem domínios globulares organizados na superfície do ribossomo. Algumas também têm extensões alongadas que se projetam para dentro do cerne de rRNA do ribossomo, estabilizando sua estrutura. As funções de algumas dessas proteínas ainda não foram elucidadas em detalhes, mas parece evidente que muitas delas têm papel estrutural.

As sequências dos rRNA de muitos organismos são hoje conhecidas. Cada um dos três rRNA de fita simples de *E. coli* tem uma conformação tridimensional específica que apresenta longos pareamentos de bases intramoleculares. Os padrões de enovelamento dos rRNA são altamente conservados em todos os organismos, principalmente as regiões envolvidas em funções-chaves (**Figura 27-15**). As estruturas secundárias propostas para os rRNA foram confirmadas, em grande parte, com base em métodos de análise estrutural, mas falham em transmitir as extensas redes de interações terciárias que parecem existir na estrutura completa.

Os ribossomos das células eucarióticas (exceto os ribossomos das mitocôndrias e dos cloroplastos) são maiores e mais complexos



Venkatraman Ramakrishnan
[Fonte: © Alastair Grant/AP
Photo.]



Thomas A. Steitz
[Fonte: © Lucas Jackson/
Reuters/Corbis.]



Ada E. Yonath
[Fonte: © Yin Bogu/Xinhua
Press/Corbis.]

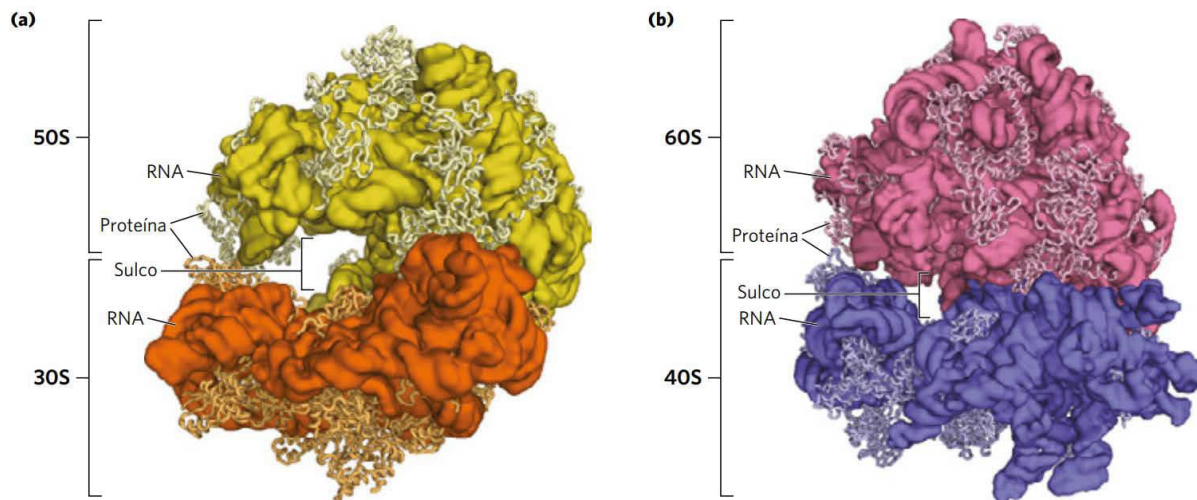


FIGURA 27-14 A estrutura dos ribossomos. Nosso conhecimento sobre a estrutura do ribossomo melhorou muito a partir de muitas imagens em alta resolução dos ribossomos de bactérias e de leveduras. **(a)** Ribossomo bacteriano. As subunidades 50S e 30S, juntas, formam a unidade ribossômica 70S. A fenda entre as duas subunidades é o local onde ocorre a síntese proteica. **(b)** O ribossomo de levedura tem uma estrutura semelhante, porém mais complexa. [Fontes: (a) obtida a partir de PDB ID 4V4I, A. Korostelev et al., *Cell* 126:1065, 2006. (b) Obtida a partir de PDB ID 4V7R, A. Ben-Shem et al., *Science* 330:1203, 2010.]

do que os ribossomos bacterianos (Figura 27-16; comparar com a Figura 27-14b), com um diâmetro de cerca de 23 nm e um coeficiente de sedimentação de cerca de 80S. Eles também têm duas subunidades, que variam em tamanho entre as espécies, mas têm, em média, 60S e 40S. Os ribossomos dos organismos eucarióticos contêm, ao todo, mais de 80 proteínas diferentes. Os ribossomos de mitocôndrias e cloroplastos são um pouco menores e mais simples do que os ribossomos das bactérias. Ainda assim, a estrutura e a função dos ribossomos são surpreendentemente semelhantes em todos os organismos e organelas.

Tanto em bactérias quanto nos eucariotos, os ribossomos são montados a partir da incorporação hierárquica das

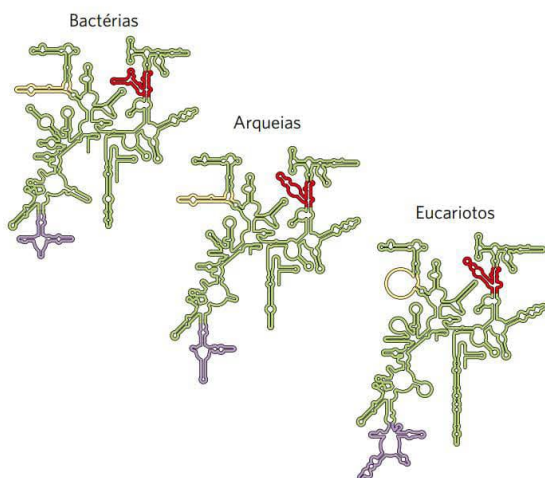


FIGURA 27-15 Conservação da estrutura secundária no rRNA da subunidade menor nos três domínios da vida. Vermelho, amarelo e lilás indicam as regiões em que as estruturas dos rRNA de bactérias, arqueias e eucariotos divergem. As regiões conservadas estão mostradas em verde. [Fonte: informação de www.rna.icmb.utexas.edu.]

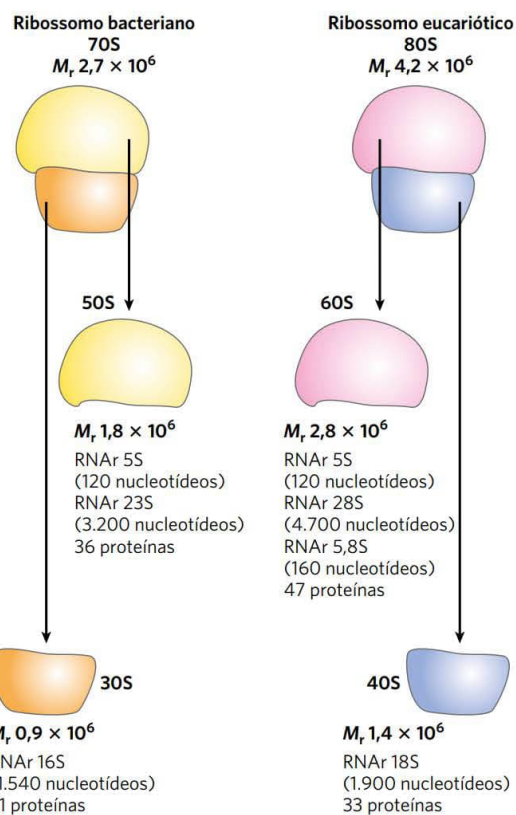


FIGURA 27-16 Resumo da composição e da massa dos ribossomos de bactérias e de eucariotos. As subunidades dos ribossomos estão identificadas pelos respectivos valores em S (unidade Svedberg), coeficientes de sedimentação relacionados com a velocidade de sedimentação em uma centrífuga. Os valores S não são aditivos quando as subunidades são combinadas, pois são proporcionais à aproximadamente 2/3 do peso molecular e são afetados pela forma da partícula.

proteínas ribossômicas à medida que os rRNA são sintetizados. Muito do processamento dos pré-rRNA (ver Figura 26-24) ocorre dentro dos grandes complexos de ribonucleoproteína. A composição desses complexos se modifica à medida que novas proteínas ribossômicas são incorporadas, os rRNA adquirem sua forma final e algumas proteínas necessárias para o processamento de rRNA se dissociam.

RNA transportadores têm características estruturais próprias

Para entender como os tRNA podem servir como adaptadores na tradução da linguagem dos ácidos nucleicos para a linguagem das proteínas, é preciso, primeiramente, examinar suas estruturas com mais detalhes. Os RNA transportadores são relativamente pequenos e são formados por uma única fita de RNA enovelada em uma estrutura tridimensional precisa (ver Figura 8-25a). Os tRNA presentes nas bactérias e no citosol de eucariotos contêm entre 73 e 93 resíduos de nucleotídeos, correspondendo a pesos moleculares de 24.000 a 31.000. As mitocôndrias e os cloroplastos têm tRNA diferentes e um pouco menores. As células têm pelo menos um tipo de tRNA para cada aminoácido; pelo menos 32 tRNA são necessários para reconhecer todos os códons de aminoácidos (alguns reconhecem mais de um códon), mas algumas células utilizam mais de 32.

O tRNA de alanina (tRNA^{Ala}) de levedura foi o primeiro ácido nucleico a ser totalmente sequenciado, por Robert Holley, em 1965. Ele contém 76 resíduos nucleotídicos, 10 dos quais têm bases modificadas. Comparações entre tRNA de várias espécies revelaram muitas características estruturais comuns a todos eles (Figura 27-17). Oito ou mais resíduos nucleotídicos têm açúcares e bases modificadas, muitos dos quais são formas metiladas derivadas das principais bases. A maioria dos tRNA tem um resíduo guanilato (pG) na extremidade 5', e todos têm a sequência trinucleotídica CCA(3') na extremidade 3'. Quando desenhado em duas dimensões, todos os tRNA possuem um padrão



Robert W. Holley,
1922-1993
[Fonte: Bettmann/Corbis.]

de ligações de hidrogênio que forma uma estrutura tipo folha de trevo com quatro braços; o tRNA mais longo tem um quinto braço curto, ou braço extra. Em três dimensões, o tRNA tem a forma de um L torcido (Figura 27-18).

Dois dos braços do tRNA são cruciais para a função adaptadora. O **braço do aminoácido** pode carregar um aminoácido específico, esterificado pelo seu grupo carboxila ao grupo 2' ou 3'-hidroxila do resíduo A presente na extremidade 3' do tRNA. O **braço do anticódon** contém o anticódon. Os outros braços importantes são o **braço D**, que contém o nucleotídeo incomum di-hidrouridina (D), e o **braço TψC**, que contém ribotimidina (T), o que não é comum nos RNA, e pseudouridina (c), que contém uma ligação incomum carbono-carbono entre a base e a ribose (ver Figura 26-22). Os braços D e TψC contribuem com interações importantes para o enovelamento das moléculas de tRNA, e o braço TψC interage com o rRNA da subunidade de maior do ribossomo.

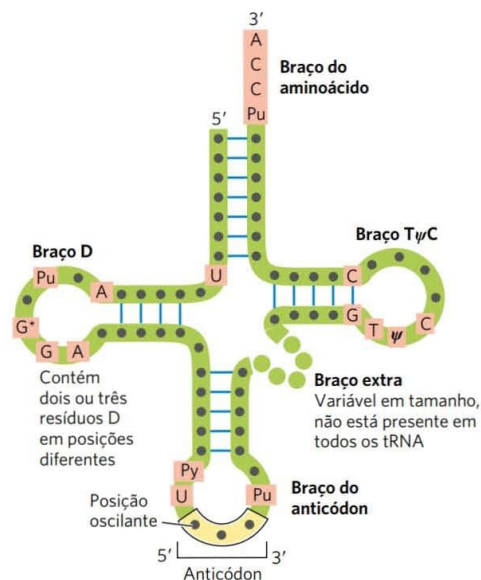


FIGURA 27-17 Estrutura secundária geral, em forma de folha de trevo, dos tRNA. Os pontos grandes ao longo da estrutura representam resíduos nucleotídicos; as linhas azuis representam pares de bases. Os resíduos característicos e/ou não variáveis comuns a todos os tRNA estão mostrados em cor salmão. Os RNA transportadores variam em comprimento, de 73 a 93 nucleotídeos. Nucleotídeos extras ocorrem no braço extra ou no braço D. Na extremidade do braço do anticódon está a alça do anticódon, a qual sempre contém sete nucleotídeos não pareados. O braço D contém dois ou três resíduos D (5,6-di-hidrouridina), dependendo do tRNA. Em alguns tRNA, o braço D tem apenas três pares de bases ligados por ligações de hidrogênio. Pu representa um nucleotídeo de purina; Py, um nucleotídeo de pirimidina; φ, pseudouridilato; G*, guanilato ou 2'-O-metilguanilato.

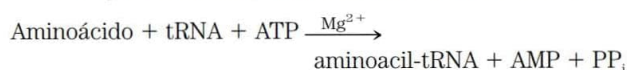
Após a análise das estruturas dos ribossomos e dos tRNA, agora serão estudados em detalhes os cinco estágios da síntese proteica.

Etapas 1: as aminoacil-tRNA-sintetases ligam os aminoácidos corretos aos seus respectivos tRNA

Durante a primeira etapa da síntese proteica, que ocorre no citosol, as aminoacil-tRNA-sintetases esterificam os 20 aminoácidos aos seus respectivos tRNA. Cada enzima é específica para um aminoácido e um ou mais tRNA correspondentes. A maioria dos organismos tem uma aminoacil-tRNA-sintetase para cada aminoácido. Para aminoácidos com dois ou mais tRNA correspondentes, a mesma enzima pode, geralmente, catalisar a aminoacilação de todos eles.

As estruturas de todas as aminoacil-tRNA-sintetases de *E. coli* já foram determinadas. Os pesquisadores as dividiram em duas classes (Tabela 27-7), com base em diferenças consideráveis nas estruturas primária e terciária e no mecanismo de reação (Figura 27-19); essas duas classes são as mesmas em todos os organismos. Não existem evidências de que as duas classes compartilham um ancestral comum, e as razões biológicas, químicas ou evolutivas para a existência de duas classes de enzimas participando de processos praticamente idênticos permanecem obscuras.

A reação catalisada por uma aminoacil-tRNA-sintetase é



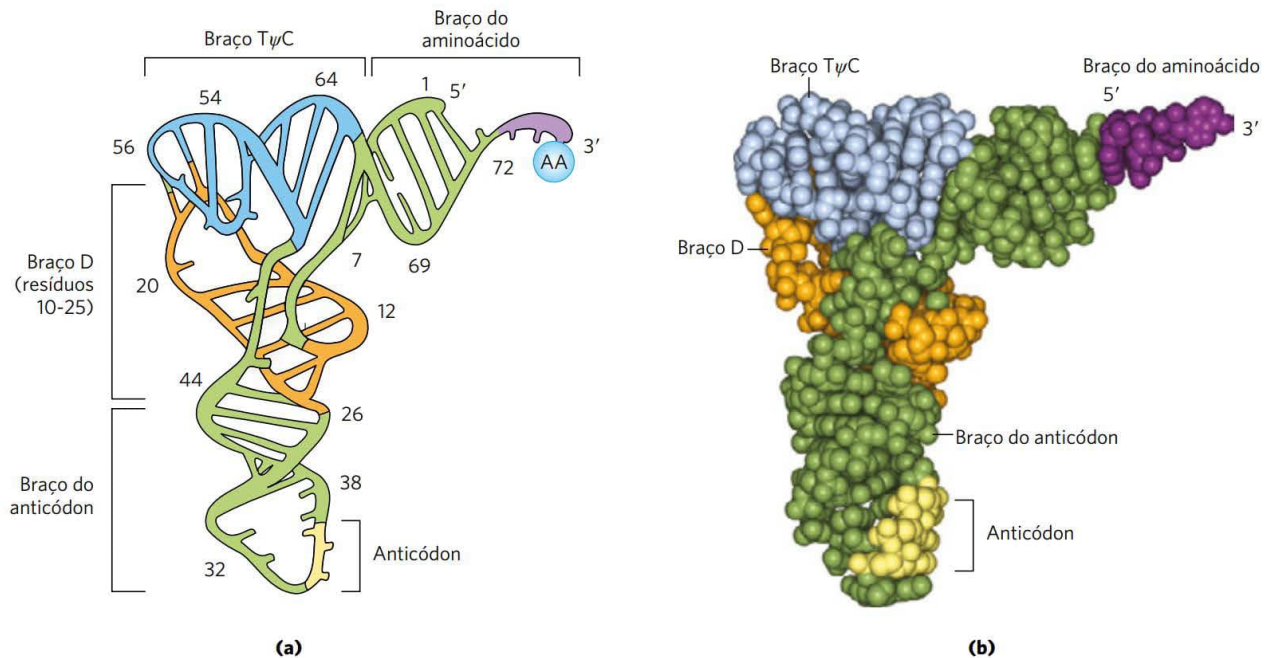
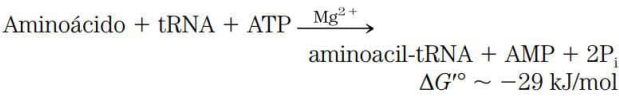


FIGURA 27-18 Estrutura tridimensional do tRNA^{Phe} de levedura, resolvida a partir de análises de difração de raios X. A forma lembra um L torcido. **(a)** Diagrama esquemático com os vários braços identificados na Figura 27-17 representados em cores diferentes. **(b)** Um modelo de preenchimento espacial usando o mesmo código de cores. A sequência CCA na extremidade 3' (em lilás) é o ponto para a ligação do aminoácido. [Fonte: (b) PDB ID 4TRA, E. Westhof et al., *Acta Crystallogr. A* 44:112, 1988.]

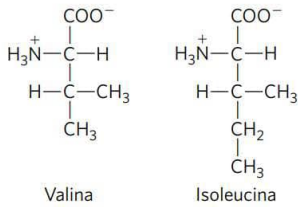
Essa reação ocorre em duas etapas no sítio ativo da enzima. Na etapa 1 (Figura 27-19), há a formação de um intermediário ligado à enzima, o aminoacil-adenilil (aminoacil-AMP). Na segunda etapa, o grupo aminoacila é transferido do aminoacil-AMP ligado à enzima para o tRNA específico correspondente. O caminho pelo qual ocorre essa segunda etapa depende da classe à qual a enzima pertence, como mostrado nas etapas 2a e 2b da Figura 27-19. A ligação resultante, um éster entre o aminoácido e o tRNA (**Figura 27-20**), tem uma energia livre padrão altamente negativa para a hidrólise ($\Delta G'^{\circ} = -29 \text{ kJ/mol}$). O pirofosfato formado na reação de ativação sofre hidrólise, formando fosfato, pela ação da pirofosfatase inorgânica. Assim, *duas* ligações fosfato de alta energia são gastas para cada molécula de aminoácido ativada, tor-

nando a reação global de ativação dos aminoácidos essencialmente irreversível:



Revisão pelas aminoacil-tRNA-sintetases A aminoacilação do tRNA cumpre duas finalidades: (1) ativa um aminoácido para a formação de uma ligação peptídica e (2) garante o posicionamento apropriado do aminoácido no polipeptídeo nascente. A identidade do aminoácido ligado a um tRNA não é conferida no ribossomo, de modo que a ligação do aminoácido correto ao tRNA é essencial para a fidelidade da síntese proteica.

Como visto no Capítulo 6, a especificidade de uma enzima é limitada pela energia de ligação disponível das interações enzima-substrato. A discriminação entre dois substratos (aminoácidos) semelhantes foi estudada em detalhes no caso da Ile-tRNA-sintetase, que distingue entre valina e isoleucina, aminoácidos que diferem em apenas um grupo metileno ($-\text{CH}_2-$):

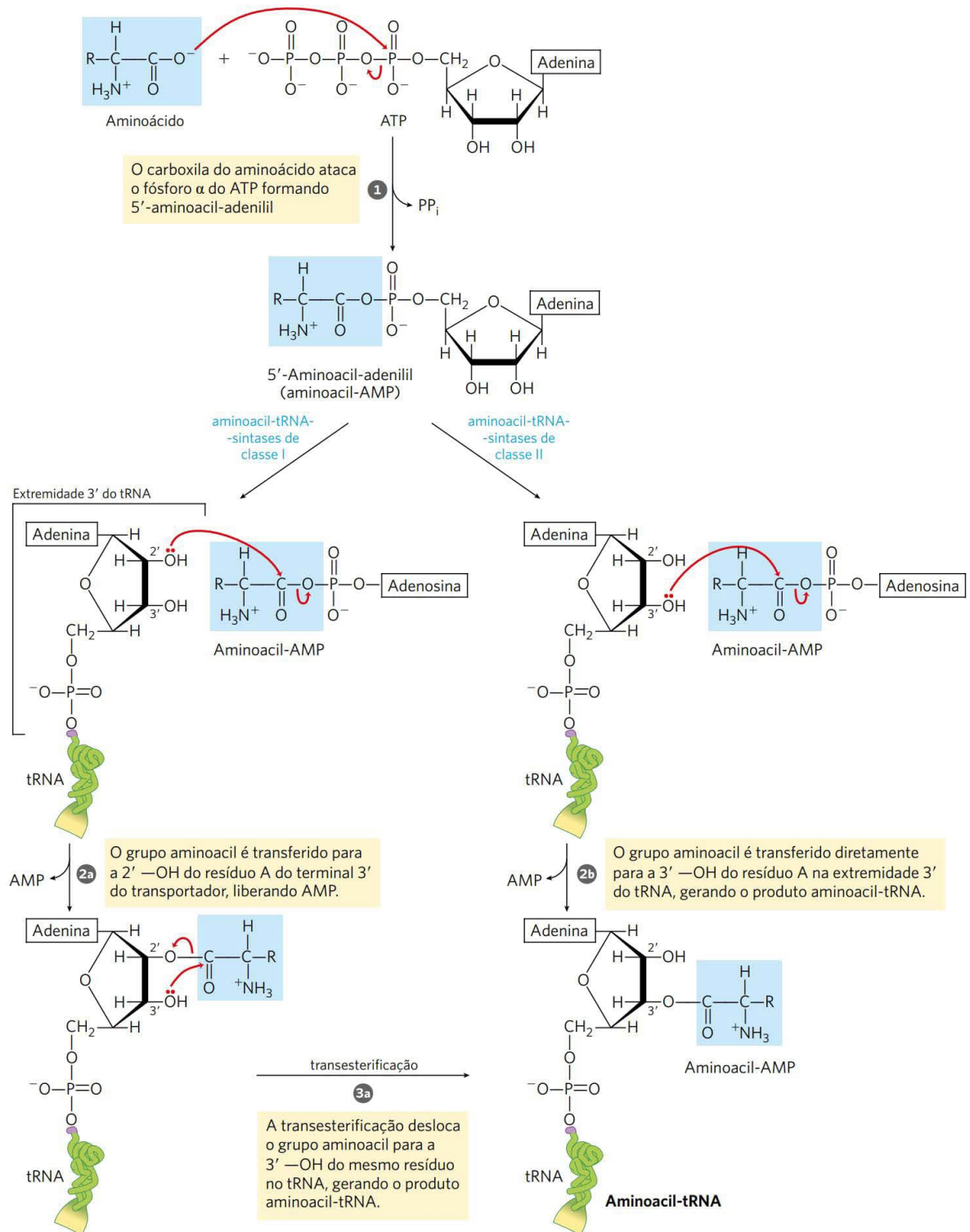


A Ile-tRNA-sintetase favorece a ativação da isoleucina (para formar Ile-AMP) em relação à valina por um fator de 200

TABELA 27-7 As duas classes de aminoacil-tRNA-sintetases

Classe I		Classe II	
Arg	Leu	Ala	Lys
Cys	Met	Asn	Phe
Gln	Trp	Asp	Pro
Glu	Tyr	Gly	Ser
Ile	Val	His	Thr

Nota: aqui, Arg representa arginil-tRNA-sintetase, e assim por diante. A classificação se aplica a todos os organismos cujas aminoacil-tRNA-sintetases já foram analisadas e tem base nas diferenças estruturais da proteína e nas diferenças dos mecanismos de ação esquematizados na Figura 27-19.



MECANISMO-FIGURA 27-19 Aminoacilação do tRNA pelas aminoacil-tRNA-sintetases. A etapa 1 é a formação de um aminoacil-adenilil, o qual permanece ligado ao sítio ativo. Na segunda etapa, o grupo aminoacil é transferido ao tRNA. O mecanismo dessa etapa é um pouco diferente para cada uma das duas classes de aminoacil-tRNA-sintetases (ver Tabela 27-7). Para as enzimas da classe I, 2a o grupo aminoacil é inicialmente transferido para o grupo hidroxila 2' do resíduo terminal 3' A e então 3a para o grupo 3'hidroxila por meio de uma reação de transesterificação. Para as enzimas da classe II, 2b o grupo aminoacil é transferido diretamente para o grupo 3'hidroxila do adenilil terminal.

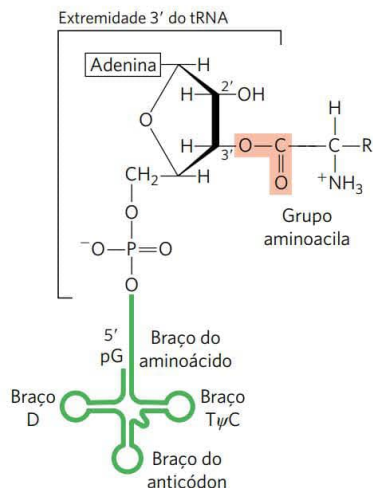


FIGURA 27-20 Estrutura geral de um aminoacil-tRNA. O grupo aminoacil é esterificado na posição 3' do resíduo A terminal. A ligação éster que ativa o aminoácido e o une ao tRNA aparece sombreada em cor salmão na figura.

vezes, como seria de se esperar, considerando o quanto um grupo metileno (na Ile) pode intensificar a ligação de um substrato. Ainda assim, a valina é erroneamente incorporada em proteínas em posições normalmente ocupadas por um resíduo de Ile, com uma frequência de apenas cerca de 1 em 3.000. Como ocorre esse aumento de mais de 10 vezes com precisão? A Ile-tRNA-sintetase, como outras aminoacil-tRNA-sintetases, tem uma atividade de revisão.

Convém lembrar de um princípio geral apresentado na discussão da revisão realizada pelas DNA-polimerases (ver Figura 25-7): se as interações de ligação disponíveis não fornecerem discriminação suficiente entre dois substratos, a especificidade necessária poderá ser obtida pela ligação específica do substrato em *duas etapas sucessivas*. Forçar o sistema por meio de dois filtros sucessivos tem um efeito multiplicativo. No caso da Ile-tRNA-sintetase, o primeiro filtro é a ligação inicial do aminoácido à enzima e a sua ativação a aminoacil-AMP. O segundo é a ligação de qualquer produto aminoacil-AMP *incorreto* em um sítio ativo separado na enzima; o substrato que se ligar nesse segundo sítio ativo é hidrolisado. O grupo R da valina é um pouco menor do que o da isoleucina, de modo que Val-AMP cabe no sítio hidrolítico (de revisão) da Ile-tRNA-sintetase, mas Ile-AMP, não. Assim, Val-AMP é hidrolisado a valina e AMP no sítio ativo de revisão, e o tRNA ligado à sintetase não é aminoacilado ao aminoácido errado.

Além da revisão após a formação do aminoacil-AMP intermediário, a maioria das aminoacil-tRNA-sintetases são capazes de hidrolisar a ligação éster entre aminoácidos e tRNA nos aminoacil-tRNA. Essa hidrólise é bastante acelerada em tRNA carregados incorretamente, fornecendo um terceiro filtro para melhorar a fidelidade do processo. As poucas aminoacil-tRNA-sintetases que ativam aminoácidos sem parentesco estrutural próximo (p. ex., Cys-tRNA-sintetase) apresentam pouca ou nenhuma atividade de revisão.

são; nesses casos, o sítio ativo para aminoacilação é capaz de discriminar entre o substrato adequado e qualquer outro aminoácido incorreto.

A taxa de erro da síntese proteica (~1 erro para cada 10^4 aminoácidos incorporados) não chega perto daquela da replicação do DNA, que é bem mais baixa. Como os defeitos nas proteínas são eliminados quando as proteínas são degradadas e não são passados adiante para as gerações seguintes, esses erros têm um significado biológico menor. O grau de fidelidade da síntese proteica é suficiente para garantir que a maioria das proteínas não contenha erros e que a grande quantidade de energia necessária para sintetizar uma proteína não seja desperdiçada. A presença de uma molécula de proteína com defeito geralmente não é importante quando muitas cópias corretas dessa mesma proteína estão presentes.

Interação entre uma aminoacil-tRNA-sintetase e um tRNA: um “segundo código genético” Uma dada aminoacil-tRNA-sintetase deve ser específica não só para determinado aminoácido, mas também para determinado tRNA. Para a fidelidade da biossíntese de proteínas, discriminar entre dezenas de tRNA é tão importante quanto distinguir entre os diferentes aminoácidos. A interação entre as aminoacil-tRNA-sintetases e os tRNA tem sido considerada um “segundo código genético”, refletindo o papel crucial que isso tem para manter a precisão da síntese proteica. As regras de “codificação” parecem ser ainda mais complexas do que aquelas do “primeiro” código.

A **Figura 27-21** resume o conhecimento atual sobre os nucleotídeos envolvidos no reconhecimento dos tRNA por algumas aminoacil-tRNA-sintetases. Alguns nucleotídeos são conservados em todos os tRNA e, portanto, não podem ser utilizados para discriminação. Observando as mudanças de nucleotídeos que alteram a especificidade de substrato, os pesquisadores identificaram as posições de nucleotídeos que são necessárias para a discriminação pelas aminoacil-tRNA-sintetases. Essas posições parecem estar concentradas no braço do aminoácido e no braço do anticódon, incluindo os nucleotídeos do próprio anticódon, mas também estão localizadas em outras partes das moléculas de tRNA. A determinação das estruturas cristalográficas de complexos entre aminoacil-tRNA-sintetases e os respectivos tRNA e ATP colaborou muito para que se conhecesse essas interações (**Figura 27-22**).

Dez ou mais nucleotídeos específicos podem estar envolvidos no reconhecimento de um tRNA pela sua respectiva aminoacil-tRNA-sintetase. Em alguns casos, contudo, o mecanismo de reconhecimento é bastante simples. Ao longo das diversas classes de organismos – de bactérias aos seres humanos –, o principal determinante para o reconhecimento do tRNA pela Ala-tRNA-sintetase é um único par de bases G=U no braço do aminoácido do tRNA^{Ala} (**Figura 27-23a**). Um RNA sintético curto, com apenas 7 pb organizados em uma mini-hélice formando um grampo, é aminoacilado pela Ala-tRNA-sintetase de maneira eficiente, desde que o RNA contenha o G=U fundamental (**Figura 27-23b**). Esse sistema relativamente simples do sistema da alanina pode ser uma relíquia evolutiva de um

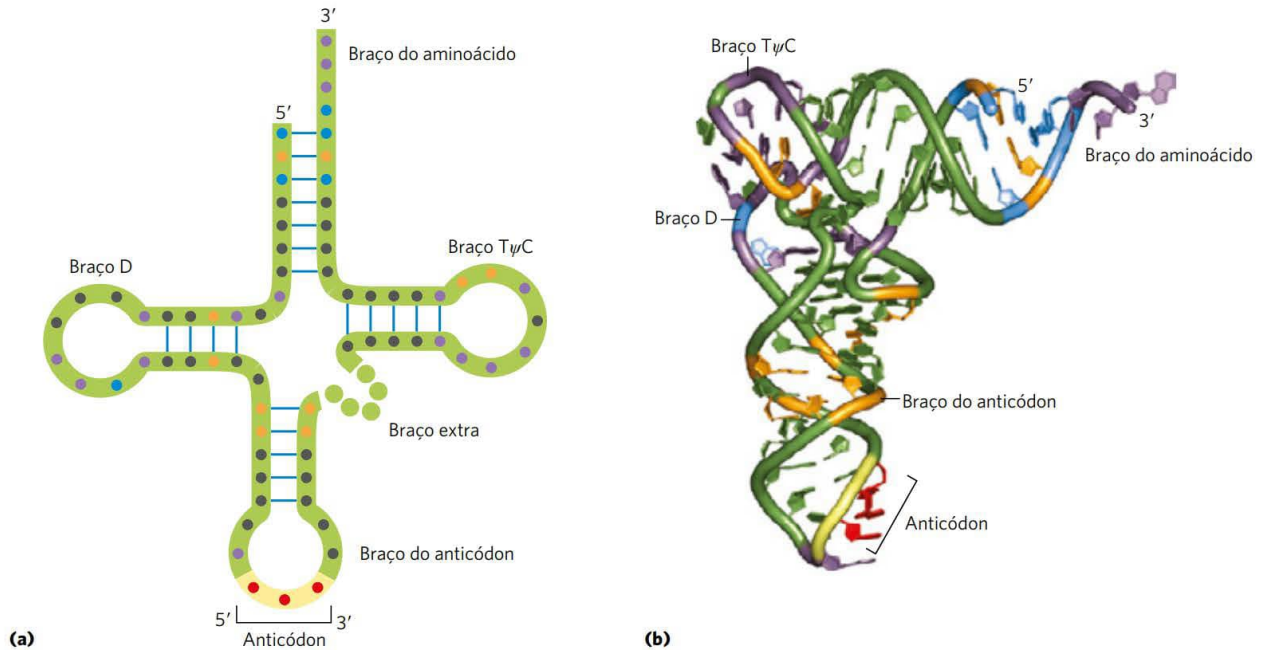


FIGURA 27-21 Posições nos tRNA dos nucleotídeos reconhecidos pelas aminoacil-tRNA-sintetases. **(a)** Algumas posições (pontos em lilás) são as mesmas em todos os tRNA e, portanto, não podem ser utilizadas para discriminar um tRNA de outro. Outras posições são conhecidas por servirem de pontos de reconhecimento por uma (em cor de laranja) ou mais (em azul) aminoacil-tRNA-sintetases. Outras características estruturais, além da sequência, são importantes para o reconhecimento por algumas sintetases. **(b)** As mesmas características estruturais estão mostradas em três dimensões, novamente com os resíduos em cor de laranja e em azul representando as posições reconhecidas por uma ou mais aminoacil-tRNA-sintetases, respectivamente. [Fonte: PDB ID 1EHZ, H. Shi e P. B. Moore, *RNA* 6:1091, 2000.]

período no qual os oligonucleotídeos de RNA, ancestrais dos tRNA, eram aminoacilados por meio de um sistema primitivo para a síntese proteica.

A interação das aminoacil-tRNA-sintetases com seus respectivos tRNA é crucial para a leitura precisa do código genético. Qualquer expansão do código para incluir novos aminoácidos teria, necessariamente, de incluir um novo par aminoacil-tRNA-sintetase:tRNA. Uma expansão limitada do código genético já foi observada na natureza; uma expansão maior foi obtida em laboratório (Quadro 27-2).

Etapa 2: um aminoácido específico inicia a síntese proteica

A síntese proteica começa na extremidade aminoterminal e prossegue com a adição passo a passo de aminoácidos em direção à extremidade carboxiterminal do polipeptídeo nascente, como determinado por Howard Dintzis, em 1961 (**Figura 27-24**). O códon de início AUG, dessa maneira, especifica um resíduo de metionina *aminoterminal*. Embora a metionina possua apenas um códon, (5')AUG, todos os organismos têm dois tRNA para metionina. Um deles é

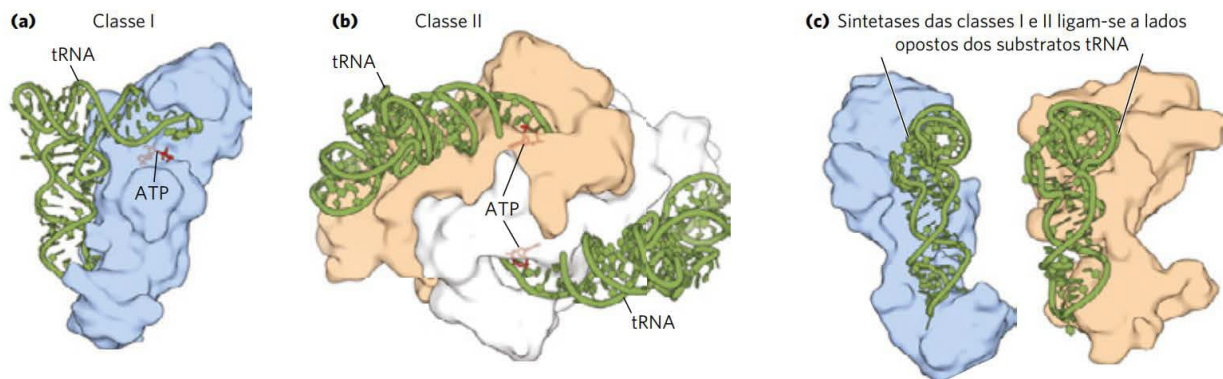


FIGURA 27-22 Aminoacil-tRNA-sintetases. As sintetases estão mostradas, formando complexos com os tRNA correspondentes (em verde). O ATP (em vermelho) ligado indica o sítio ativo próximo à extremidade do braço aminoacil. **(a)** Gln-tRNA-sintetase de *E. coli*, uma sintetase monomérica típica da classe I. **(b)** Asp-tRNA-sintetase de levedura, uma sintetase dimérica típica da classe II. **(c)** As duas classes das aminoacil-tRNA-sintetases reconhecem faces diferentes dos seus respectivos substratos tRNA. [Fontes: (a, c {à esquerda}) PDB ID 1QRT, J. G. Arnez e T. A. Steitz, *Biochemistry* 35:14,725, 1996. (b, c {à direita}) PDB ID 1ASZ, J. Cavarelli et al., *EMBO J.* 13:327, 1994.]

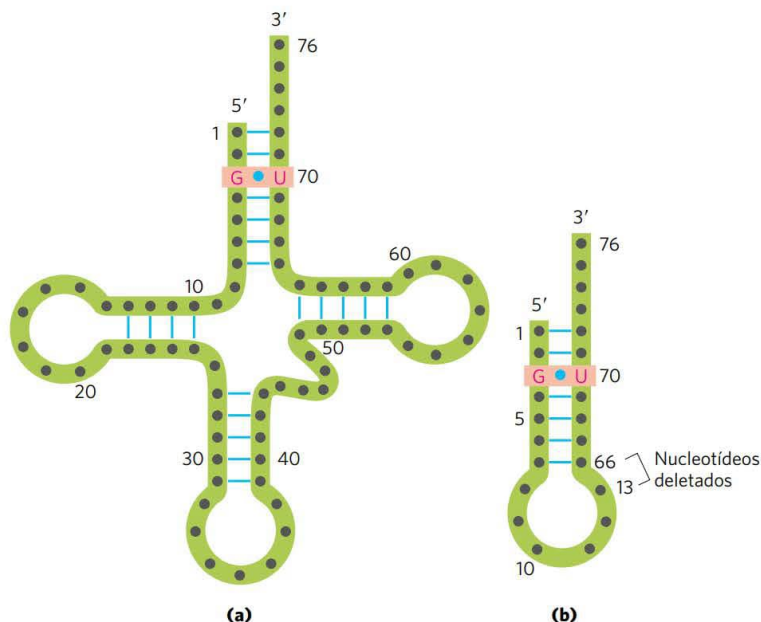
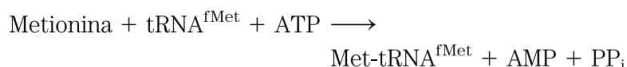


FIGURA 27-23 Elementos estruturais do tRNA^{Ala} necessários para o reconhecimento pela Ala-tRNA-sintetase. (a) Os elementos estruturais do tRNA^{Ala} reconhecidos pela Ala-tRNA-sintetase são incomumente simples. Um único par de bases G=U é o único elemento necessário para a ligação específica e para a aminoacilação. (b) Uma mini-hélice curta de RNA sintético, com o par de bases G=U crítico, mas sem a maior parte das estruturas de um tRNA. Essa molécula é aminoacilada especificamente com alanina de forma quase tão eficiente quanto o tRNA^{Ala} completo.

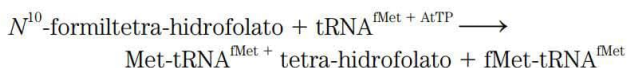
utilizado exclusivamente quando (5')AUG é o códon de início para a síntese proteica. O outro é utilizado para codificar resíduos Met em posições internas no polipeptídeo.

A diferença entre um (5')AUG iniciador e um interno é direta. Em bactérias, os dois tipos de tRNA específicos para metionina são representados por tRNA^{Met} e tRNA^{fMet}. O aminoácido incorporado em resposta ao códon de início

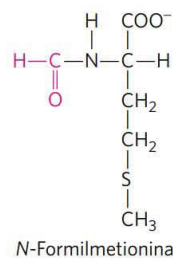
(5')AUG é a *N*-formilmetionina (fMet). Ele chega ao ribossomo como *N*-formilmetionil-tRNA^{fMet} (fMet-tRNA^{fMet}), o qual é formado em duas reações sucessivas. Primeiro, a metionina é ligada ao tRNA^{Met} pela Met-tRNA-sintetase (a qual, em *E. coli*, aminoacila tanto o tRNA^{fMet} quanto o tRNA^{Met}):



Em seguida, uma transformilase transfere um grupo formila do *N*¹⁰-formiltetra-hidrofolato para o grupo amino do resíduo Met:



A transformilase é mais seletiva do que a Met-tRNA-sintetase; ela é específica para resíduos de Met ligados ao tRNA^{fMet}, presumivelmente reconhecendo alguma característica estrutural única daquele tRNA. Por outro lado, Met-tRNA^{Met} insere metionina em posições internas nos polipeptídeos.



A adição do grupo *N*-formil ao grupo amina da metionina pela transformilase impede que a fMet entre em posições internas em um polipeptídeo e, ao mesmo tempo, permite que o fMet-tRNA^{fMet} se ligue em um sítio de iniciação específico no ribossomo, o qual não aceita Met-tRNA^{Met} nem qualquer outro aminoacil-tRNA.

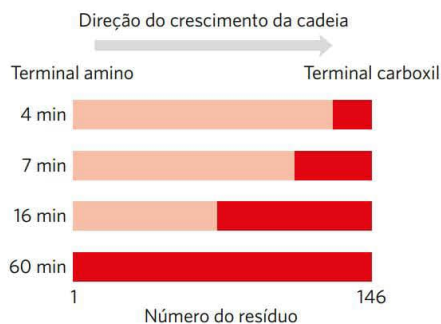


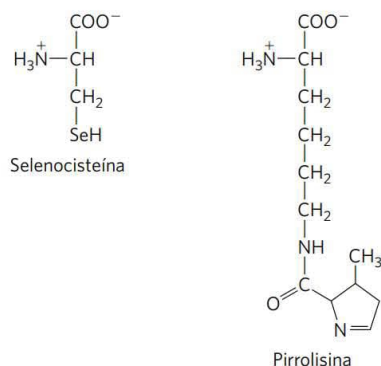
FIGURA 27-24 Prova de que os polipeptídeos crescem pela adição de resíduos de aminoácidos em direção à porção carboxiterminal: o experimento de Dintzis. Reticulócitos (eritrócitos imaturos) sintetizando ativamente hemoglobina foram incubados com leucina radioativa (selecionada porque leucina ocorre várias vezes nas cadeias de α e β -globina). Amostras de cadeias α completas foram, então, isoladas dos reticulócitos em intervalos de tempo, e a distribuição da radioatividade foi determinada. As zonas em vermelho-escuro mostram as porções das cadeias completas de α -globina contendo resíduos de Leu radioativos. Aos 4 minutos, apenas alguns resíduos na extremidade carboxila da α -globina estavam marcados, pois as únicas cadeias completas de globina com marcador incorporado após 4 minutos eram aquelas cuja síntese estava praticamente completa no momento em que o marcador foi adicionado. Com mais tempo de incubação, segmentos sucessivamente mais longos do polipeptídeo apresentaram resíduos marcados, sempre em um bloco na extremidade carboxila. A extremidade não marcada do polipeptídeo (aminoterminal) foi, então, identificada como a extremidade iniciadora, ou seja, os polipeptídeos crescem por adições sucessivas de aminoácidos na extremidade carboxila.

QUADRO 27-2 Expansão natural e artificial do código genético

Como foi visto, os 20 aminoácidos comumente encontrados nas proteínas oferecem somente funcionalidade química limitada. Os sistemas vivos geralmente superam essas limitações, utilizando cofatores enzimáticos ou modificando alguns aminoácidos após terem sido incorporados nas proteínas. A princípio, a expansão do código genético para introduzir novos aminoácidos nas proteínas oferece outro caminho para novas funcionalidades, porém é um caminho muito difícil de ser seguido. Essa mudança pode facilmente resultar na inativação de milhares de proteínas celulares.

Expandir o código genético para incluir um novo aminoácido requer várias mudanças celulares. Em geral, uma nova aminoacil-tRNA-sintetase deve estar presente, junto com o tRNA correspondente. Esses dois novos componentes devem ser altamente específicos, interagindo apenas entre si e com o novo aminoácido. O novo aminoácido deve estar presente em concentrações significativas na célula, o que envolve a evolução de novas vias metabólicas. Como mostrado no Quadro 27-1, o anticódon presente nesse novo tRNA faria, provavelmente, um pareamento com um códon que normalmente especifica terminação. Realizar todo esse trabalho em uma célula parece improvável, mas já ocorreu tanto na natureza quanto no laboratório.

Existem, na verdade, 22 em vez de 20 aminoácidos especificados pelo código genético. Os dois aminoácidos extras são a selenocisteína e a pirrolisina, os quais são encontrados em poucas proteínas, mas ambos oferecem uma noção da complexidade da evolução do código genético.



Em todas as células, algumas proteínas (como a formato-desidrogenase nas bactérias e a glutatona-peroxidase nos mamíferos) requerem selenocisteína para sua atividade. Em *E. coli*, a selenocisteína é introduzida na enzima formato-desidrogenase durante a tradução, em resposta a um códon UGA presente na fase de leitura. Um tipo especial de Ser-tRNA, presente em níveis mais baixos do que outros Ser-tRNA, reconhece UGA e nenhum outro códon. Esse tRNA é carregado com serina pela serina-aminoacil-tRNA-sintetase normal, e a serina é convertida enzimaticamente em selenocisteína por uma outra enzima, antes de ser usada pelo ribossomo. O tRNA

carregado com selenocisteína não reconhece qualquer códon UGA; algum sinal no contexto do mRNA, que ainda está por ser identificado, garante que esse tRNA reconheça apenas os poucos códons UGA presentes dentro de alguns genes que especificam selenocisteína. De fato, UGA possui duas funções, codifica a terminação e (muito raramente) a incorporação de selenocisteína. Essa expansão do código tem um tRNA específico, como descrito antes, mas não tem uma aminoacil-tRNA-sintetase específica. O processo funciona para selenocisteína, mas pode-se considerar que ele é uma etapa intermediária na evolução de uma definição de código completamente nova.

A pirrolisina é encontrada em um grupo de arqueobactérias anaeróbicas, denominadas metanogênicas (ver Quadro 22-1). Esses organismos produzem metano como parte de seu metabolismo, sendo que o grupo das Methanobacteriaceae pode utilizar metilaminas como substratos para a metanogênese. Para produzir metano a partir de monometilamina, é necessária a presença da enzima monometilamina-metiltransferase. O gene que codifica essa enzima tem um códon de terminação UAG na fase de leitura. A estrutura da metiltransferase foi elucidada em 2002, revelando a presença do novo aminoácido pirrolisina na posição especificada pelo códon UAG. Experimentos subsequentes demonstraram que, ao contrário da selenocisteína, a pirrolisina era ligada diretamente a um tRNA específico por uma pirrolisil-tRNA-sintetase específica. Essas células produzem pirrolisina por meio de uma via metabólica que ainda precisa ser elucidada. Todo o sistema apresenta as características típicas de um código genético já estabelecido, mas só funciona para códons UAG presentes nesse gene em particular. Como no caso da selenocisteína, existem, provavelmente, sinais contextuais que direcionam esse tRNA para o códon UAG correto.

Será que os cientistas conseguem competir com tal proeza evolutiva? Modificações de proteínas com vários grupos funcionais podem fornecer pistas importantes sobre a atividade e/ou a estrutura das proteínas. No entanto, modificar proteínas é muito trabalhoso. Por exemplo, um pesquisador que deseja ligar um novo grupo a um resíduo Cys específico deverá, de alguma maneira, bloquear os demais resíduos Cys que, porventura, estejam presentes na mesma proteína. Se, em vez disso, ele pudesse adaptar o código genético de forma a permitir que a célula inserisse um aminoácido modificado em um local específico na proteína, o processo seria muito mais conveniente. Peter Schultz e colaboradores fizeram exatamente isso.

Para desenvolver uma nova especificação para um códon, são necessários, como já foi citado, uma nova aminoacil-tRNA-sintetase e um novo tRNA correspondente, ambos adaptados para funcionar com apenas o novo aminoácido. As tentativas para criar uma expansão “artificial” do código genético foram centradas, inicialmente, em *E. coli*. O códon UAG foi escolhido como o melhor alvo para codificar um novo aminoácido. Dos

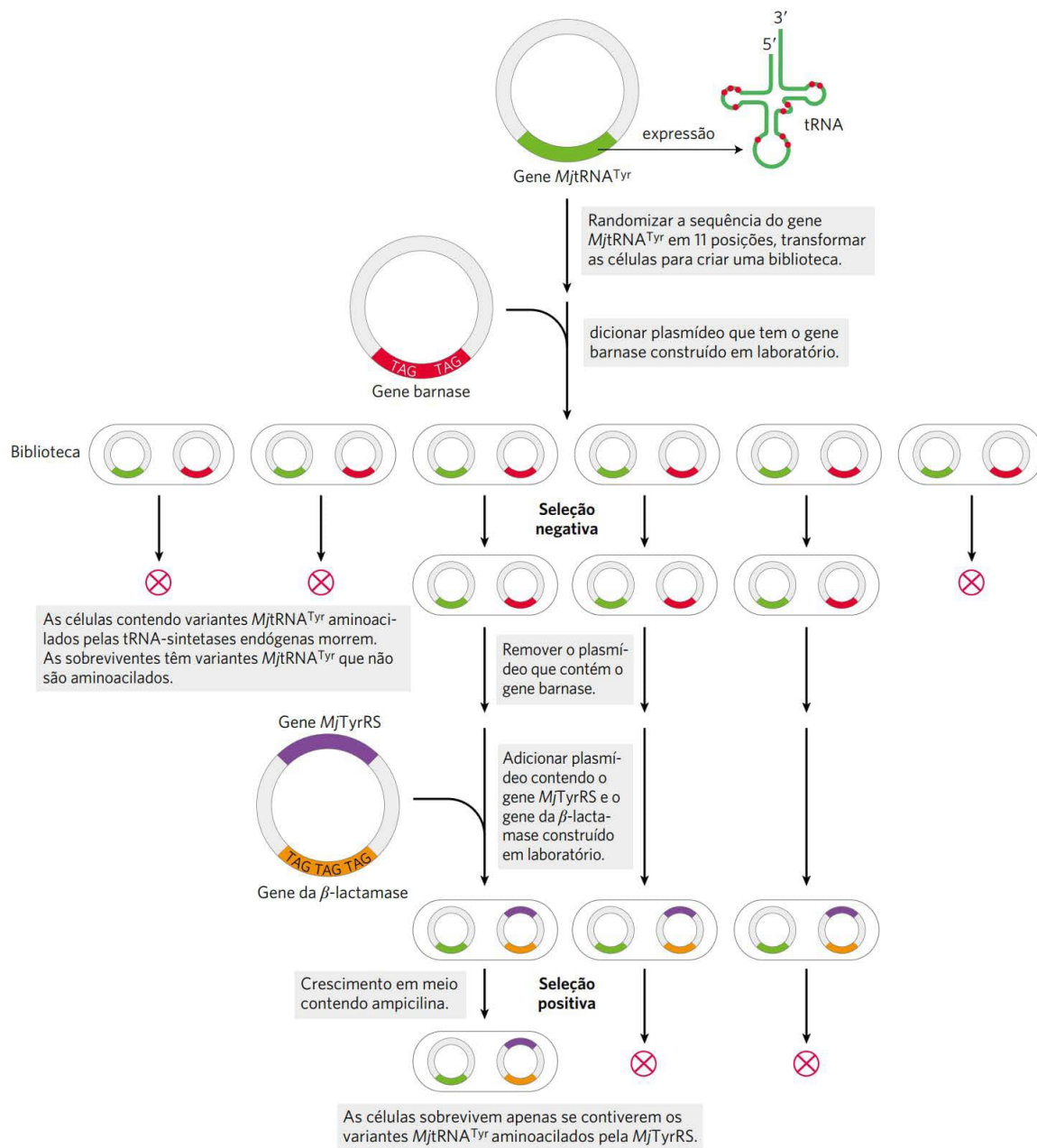


FIGURA Q-1 Seleção de variantes *MjtrNA^{Tyr}* que funcionam apenas com a tirosila-tRNA-sintetase *MjTyrRS*. A sequência do gene que codifica a *MjtrNA^{Tyr}*, presente em um plasmídeo, é randomizada em 11 posições que não interagem com a *MjTyrRS* (pontos vermelhos). Os plasmídeos mutantes são introduzidos em células de *E. coli* para gerar uma biblioteca de milhões de variantes de *MjtrNA^{Tyr}*, representadas pelas seis células mostradas aqui. O gene tóxico da barnase, construído em laboratório para conter a sequência TAG, de forma que o seu transcrito possua códons UAG, é introduzido em um plasmídeo separado, fornecendo uma seleção negativa. As células morrem caso esse gene seja expresso. A sua expressão só pode acontecer se a variante *MjtrNA^{Tyr}* expressa por essa célula for aminoacilado pela aminoacil-tRNA-sintetase endógena (de *E. coli*), inserindo um aminoácido, em vez de terminar a tradução. Outro gene, que codifica a β-lactamase e que também foi modificado em laboratório para conter a sequência TAG, a fim de produzir códons de término UAG, é inserido em outro plasmídeo, o qual também expressa o gene que codifica a *MjTyrRS*. Isso funciona como uma forma de seleção positiva para as demais variantes de *MjtrNA^{Tyr}*. Aquelas variantes que forem aminoaciladas pela *MjTyrRS* permitem a expressão do gene da β-lactamase, o qual, por sua vez, permite que as células cresçam na presença de ampicilina. Vários ciclos de seleção negativa e de seleção positiva geraram as melhores variantes de *MjtrNA^{Tyr}* aminoaciladas unicamente pela *MjTyrRS* e utilizadas de maneira eficiente na tradução.

(Continua)

QUADRO 27-2 Expansão natural e artificial do código genético (*Continuação*)

três códons de término, UAG é o menos utilizado, e linhagens com tRNA selecionados para reconhecer UAG (ver Quadro 27-3) não apresentam defeitos no crescimento das bactérias. Para criar um novo tRNA e uma nova tRNA-sintetase, os genes da tRNA^{Tyr} e a correspondente tirosila-tRNA-sintetase foram obtidos de *Methanococcus jannaschii* (MjtRNA^{Tyr} e MjTyrRS, respectivamente). A MjTyrRS não se liga à alça do anticódon do MjtRNA^{Tyr}, permitindo que a alça do anticódon seja modificada para CUA (complementar a UAG) sem afetar a interação. Devido ao fato de que os sistemas de bactérias e de arqueias são ortólogos, os componentes modificados das arqueias puderam ser transferidos para *E. coli* sem romper o sistema de tradução intrínseco da célula bacteriana.

Primeiro, o gene que codifica o MjtRNA^{Tyr} teve de ser modificado para gerar um tRNA ideal – que não fosse reconhecido por qualquer aminoacil-tRNA-sintetase endógena de *E. coli*, mas que fosse aminoacilado pela MjTyrRS. Vários ciclos de seleção negativa e de seleção positiva foram planejados e realizados para que fosse possível encontrar de maneira eficiente essa variante em meio a outras variantes do gene do tRNA (Figura Q-1). Partes da sequência do MjtRNA^{Tyr} foram trocadas aleatoriamente, permitindo a criação de uma biblioteca de células, em que cada uma expressava uma versão diferente do tRNA. Um gene codificando barnase (uma ribonuclease tóxica para *E. coli*) foi modificado de forma que o seu transcrito (mRNA) contivesse vários códons UAG, e esse gene também foi introduzido, nas células, por um plasmídeo. Se a variante de MjtRNA^{Tyr} expressa em uma determinada célula da biblioteca fosse aminoacilada por uma tRNA-sintetase endógena, ela passaria a expressar o gene da barnase, e essa célula morreria (seleção negativa). As células sobreviventes conteriam as variantes de MjtRNA^{Tyr} que não foram aminoaciladas pelas tRNA-sintetases endógenas, mas com potencial de serem aminoaciladas pela MjTyrRS. Uma seleção positiva (Figura Q-1) foi, então, obtida por meio da modificação do gene da

β -lactamase (que confere resistência ao antibiótico ampicilina) para que seu transcrito contivesse vários códons UAG e da introdução desse gene nas células junto com o gene que codifica a MjTyrRS. As variantes de MjtRNA^{Tyr} que fossem aminoaciladas pela MjTyrRS permitiriam o crescimento das células em meio contendo ampicilina somente quando a MjTyrRS também fosse expressa nessa mesma célula. Vários ciclos desse esquema de seleção negativa e de seleção positiva permitiram a identificação de uma nova variante de MjtRNA^{Tyr} que não era afetada por enzimas endógenas, que era aminoacilada pela MjTyrRS e que funcionava bem na tradução.

Em segundo lugar, a MjTyrRS teve de ser modificada para reconhecer o novo aminoácido. O gene que codifica a MjTyrRS foi dessa vez mutado para criar uma grande biblioteca de variantes. As variantes que iriam aminoacilar a nova variante de MjtRNA^{Tyr} com aminoácidos endógenos foram eliminadas utilizando-se a seleção com o gene da barnase. Uma segunda seleção positiva (semelhante à seleção com ampicilina descrita anteriormente) foi realizada, de forma que as células sobrevivessem somente se a variante de MjtRNA^{Tyr} fosse aminoacilada apenas na presença do aminoácido não natural. Vários ciclos de seleção negativa e de seleção positiva geraram um par tRNA-sintetase – tRNA capaz de reconhecer apenas o aminoácido não natural.

Utilizando essa abordagem, os pesquisadores construíram muitas cepas de *E. coli*, cada uma delas capaz de incorporar um determinado aminoácido não natural na proteína em resposta à presença do códon UAG. A mesma abordagem tem sido utilizada para expandir artificialmente o código genético de leveduras e até mesmo de células de mamíferos. Mais de 30 aminoácidos diferentes (Figura Q-2) podem ser introduzidos com eficiência em sítios específicos em proteínas clonadas dessa maneira. Como resultado, tem-se uma ferramenta cada vez mais útil e flexível para avançar nos estudos sobre a estrutura e a função das proteínas.

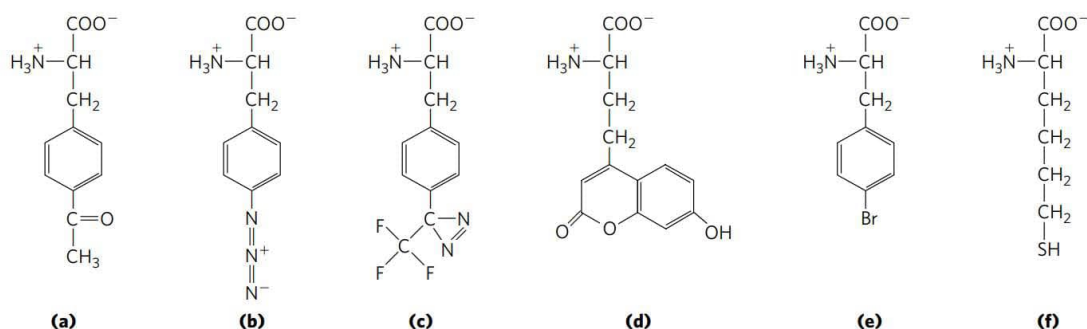


FIGURA Q-2 Uma amostra dos aminoácidos não naturais que já foram adicionados ao código genético. Esses aminoácidos contribuem com grupos com reatividades químicas únicas, como (a) cetona, (b) azida, (c) ligação fotoativada (grupo funcional planejado para formar ligações covalentes com um grupo próximo quando ativado pela luz), (d) aminoácido altamente fluorescente, (e) aminoácido com átomo pesado (Br) para uso em cristalografia e (f) um análogo de cisteína de cadeia longa, com a capacidade de formar ligações dissulfeto mais ampla. [Fonte: informações de J. Xie e P. G. Schultz, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7:775, 2006.]

Em células eucarióticas, todos os polipeptídeos sintetizados por ribossomos citosólicos iniciam com um resíduo Met (em vez de fMet), mas, novamente, a célula utiliza um tRNA iniciador especializado, que é diferente do tRNA^{Met} utilizado em códons (5')AUG em posições internas no mRNA. Os polipeptídeos sintetizados pelos ribossomos das mitocôndrias e dos cloroplastos, entretanto, iniciam com *N*-formilmetionina. Esse fato corrobora a ideia de que as mitocôndrias e os cloroplastos se originaram de bactérias ancestrais que foram simbioticamente incorporadas em células eucarióticas precursoras em um estágio primordial da evolução (ver Figura 1-40).

Como pode um único códon (5')AUG determinar se será inserida uma *N*-formilmetionina inicial (ou metionina, em eucariotos) ou um resíduo Met interno? Os detalhes do processo de iniciação fornecem a resposta.

As três fases da iniciação A **iniciação** da síntese de um polipeptídeo em bactérias requer (1) a subunidade 30S do ribossomo, (2) o mRNA que codifica o polipeptídeo a ser produzido, (3) o fMet-tRNA^{fMet} iniciador, (4) um conjunto de três proteínas, denominadas fatores de iniciação (IF1, IF2 e IF3), (5) GTP, (6) a subunidade 50S do ribossomo e (7) Mg⁺². A formação do complexo de iniciação se dá em três etapas (**Figura 27-25**).

Na etapa 1, a subunidade 30S do ribossomo se liga a dois fatores de iniciação, IF1 e IF3. O fator IF3 impede que as subunidades 30S e 50S se combinem prematuramente. O mRNA se liga, então, à subunidade 30S. O (5')AUG iniciador é guiado até sua posição correta pela **sequência de Shine-Dalgarno** (assim denominada em virtude dos pesquisadores australianos que a identificaram, John Shine e Lynn Dalgarno), presente no mRNA. Essa sequência-consenso é um sinal de iniciação contendo de 4 a 9 resíduos de purina, 8 a 13 pb no lado 5' do códon de início (**Figura 27-26a**). A sequência realiza um pareamento de bases com uma sequência complementar rica em pirimidina próxima à extremidade 3' do rRNA 16S da subunidade 30S do ribossomo (**Figura 27-26b**). Essa interação mRNA-rRNA coloca a sequência iniciadora (5')AUG do mRNA em uma posição precisa da subunidade 30S, onde ela é necessária para o início da tradução. O (5')AUG específico no qual o fMet-tRNA^{fMet} deve se ligar é diferenciado de outros códons de metionina pela sua proximidade à sequência Shine-Dalgarno no mRNA.

Os ribossomos bacterianos têm três sítios que ligam tRNA, o **sítio aminoacila (A)**, o **sítio peptidil (P)** e o sítio de **sítio de saída (E)** (do inglês, *exit*). Os sítios A e P se ligam a um aminoacil-tRNA, ao passo que o sítio E se liga apenas a tRNA não carregados, que já completaram sua tarefa no ribossomo. Ambas as subunidades 30S e 50S contribuem para as características dos sítios A e P, ao passo que o sítio E é amplamente restrito à subunidade 50S. O (5')AUG iniciador é posicionado no sítio P, o único sítio ao qual o fMet-tRNA^{fMet} consegue se ligar (**Figura 27-25**). O fMet-tRNA^{fMet} é o único aminoacil-tRNA que se liga primeiro ao sítio P; durante o estágio seguinte, estágio de alongamento, todos os outros aminoacil-tRNA que chegam (incluindo o Met-tRNA^{Met}, que se liga a códons AUG internos), ligam-se primeiro ao sítio A e só depois aos sítios P e E. O sítio E é

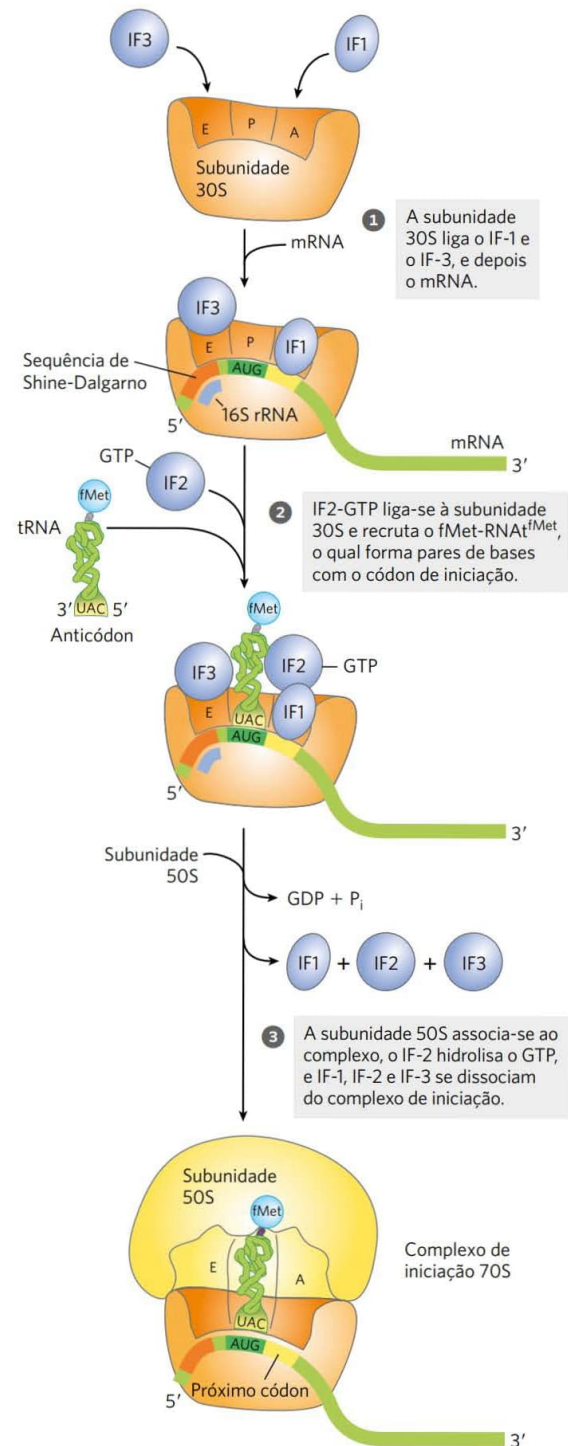


FIGURA 27-25 Formação do complexo de iniciação em bactérias.

O complexo é formado em três etapas (descritas no texto) à custa da hidrólise de GTP, gerando GDP e P_i. IF1, IF2 e IF3 são os fatores de iniciação. E designa o sítio de saída, P, o sítio peptidil, e A, o sítio aminoacila. Aqui, o anticódon do tRNA está orientado no sentido de 3' para 5', da esquerda para a direita, como na Figura 27-8, mas contrário à orientação mostrada nas Figuras 27-21 e 27-23.

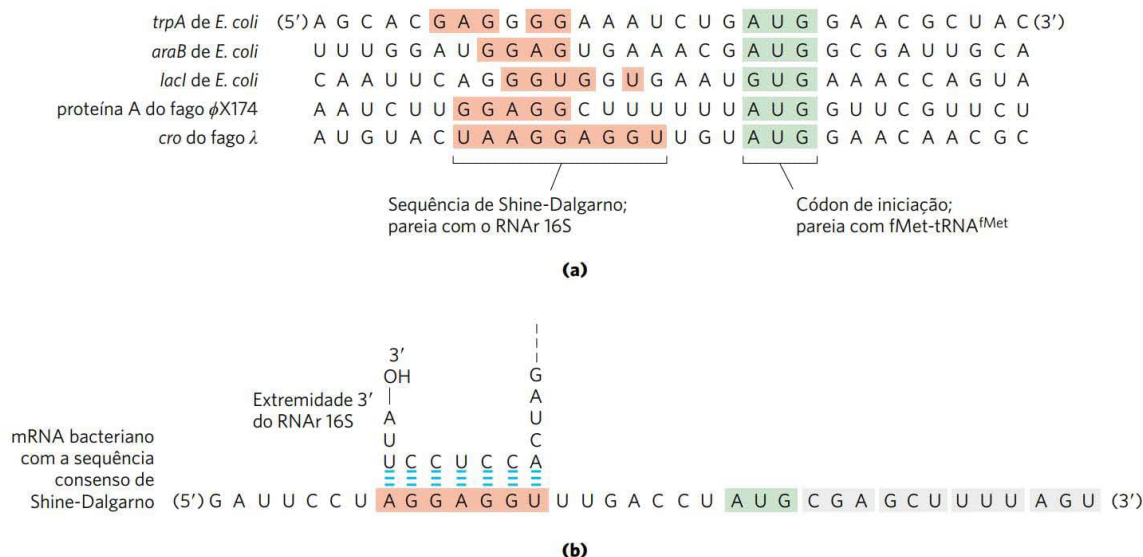


FIGURA 27-26 Sequências do RNA mensageiro que servem como sinais para iniciar a síntese proteica em bactérias. (a) O alinhamento do AUG iniciador (mostrado em verde) na sua posição correta na subunidade 30S do ribossomo depende, em parte, das sequências de Shine-Dalgarno situadas a montante (em bege). As porções do transcrito de mRNA de cinco genes bacterianos estão mostradas. Observe esse exemplo raro da proteína LacI de *E. coli*, que inicia com o códon GUG (Val) (ver Quadro 27-1). Em *E. coli*, AUG é o códon de início em cerca de 91% dos genes, com GUG (7%) e UUG (2%) assumindo essa função mais raramente. (b) A sequência de Shine-Dalgarno do mRNA pareia com uma sequência próxima da extremidade 3' do rRNA 16S.

o sítio pelo qual os tRNA “não carregados” saem durante o alongamento. O fator IF1 se liga ao sítio A e impede a ligação do tRNA nesse sítio durante a iniciação.

Na etapa 2 do processo de iniciação (Figura 27-25), o complexo constituído pela subunidade 30S do ribossomo, do IF3 e do mRNA se junta ao IF2 ligado a GTP e ao fMet-tRNA^{fMet} iniciador. O anticódon desse tRNA pareia, então, corretamente com o códon de início do mRNA.

Na etapa 3, esse grande complexo se combina com a subunidade 50S do ribossomo; simultaneamente, o GTP ligado ao IF2 é hidrolisado a GDP e P_i, os quais são liberados do complexo. Neste ponto, todos os três fatores de iniciação se dissociam do ribossomo.

O término das etapas mostradas na Figura 27-25 produz um ribossomo funcional 70S, chamado de **complexo de iniciação**, que contém o mRNA e o fMet-tRNA^{fMet} iniciador. A ligação correta do fMet-tRNA^{fMet} no sítio P no complexo de iniciação 70S é garantida por, pelo menos, três pontos de reconhecimento e de ligação: a interação códon-anticódon envolvendo o AUG iniciador posicionado no sítio P; a interação entre a sequência de Shine-Dalgarno do mRNA e o rRNA 16S; e as interações de ligação entre o sítio P do ribossomo e o fMet-tRNA^{fMet}. O complexo de iniciação agora está pronto para o alongamento.

Iniciação em células eucarióticas A tradução é, de modo geral, semelhante em células eucarióticas e em células bacterianas; a maioria das diferenças significativas estão no número de componentes e nos detalhes dos mecanismos. O processo de iniciação em eucariotos está esquematizado na Figura 27-27. O mRNA de eucariotos se liga ao ribossomo, formando um complexo com várias proteínas ligantes específicas. As células eucarióticas têm pelo menos 12 fato-

res de iniciação. Os fatores de iniciação eIF1A e eIF3 são homólogos funcionais do IF1 e do IF3 bacterianos, ligando-se à subunidade 40S na etapa 1 e bloqueando a ligação do tRNA ao sítio A e o acoplamento prematuro da subunidade maior com a subunidade menor do ribossomo, respectivamente. O fator eIF1 se liga ao sítio E. O tRNA iniciador carregado se liga ao eIF2, o qual também tem uma molécula GTP ligada. Na etapa 2, esse complexo ternário se liga à subunidade ribossômica 40S, junto com outras duas proteínas envolvidas em etapas posteriores, eIF5 (que não está mostrada na Figura 27-27) e eIF5B. Esses componentes formam o complexo de pré-iniciação 43S. O mRNA se liga ao complexo eIF4F, o qual, na etapa 3, é o intermediário na associação com o complexo de pré-iniciação 43S. O complexo eIF4F é formado por eIF4E (ligando o 5' cap), eIF4A (com atividade ATPase e RNA-helicase) e eIF4G (uma proteína ligadora). A proteína eIF4G se liga ao eIF3 e ao eIF4E, estabelecendo a primeira ligação entre o complexo de pré-iniciação 43S e o mRNA. O eIF4G também se liga à proteína ligante da cauda poli(A) (PABP, do inglês, *poly(A) binding protein*) na extremidade 3' do mRNA, circularizando o mRNA (Figura 27-28) e facilitando a regulação da expressão gênica, como descrito no Capítulo 28.

A adição do mRNA e seus fatores associados formam o complexo 48S. Esse complexo escaneia o mRNA, iniciando no 5' cap até que seja encontrado um códon AUG. Esse processo de escaneamento ou varredura (etapa 4 da Figura 27-27) é facilitado pela atividade da RNA-helicase do eIF4A e por um outro fator (eIF4B, que não aparece na Figura 27-27), cuja atividade molecular exata ainda não é conhecida.

Uma vez que sítio AUG é encontrado, a subunidade 60S do ribossomo se associa com o complexo na etapa 5, o que

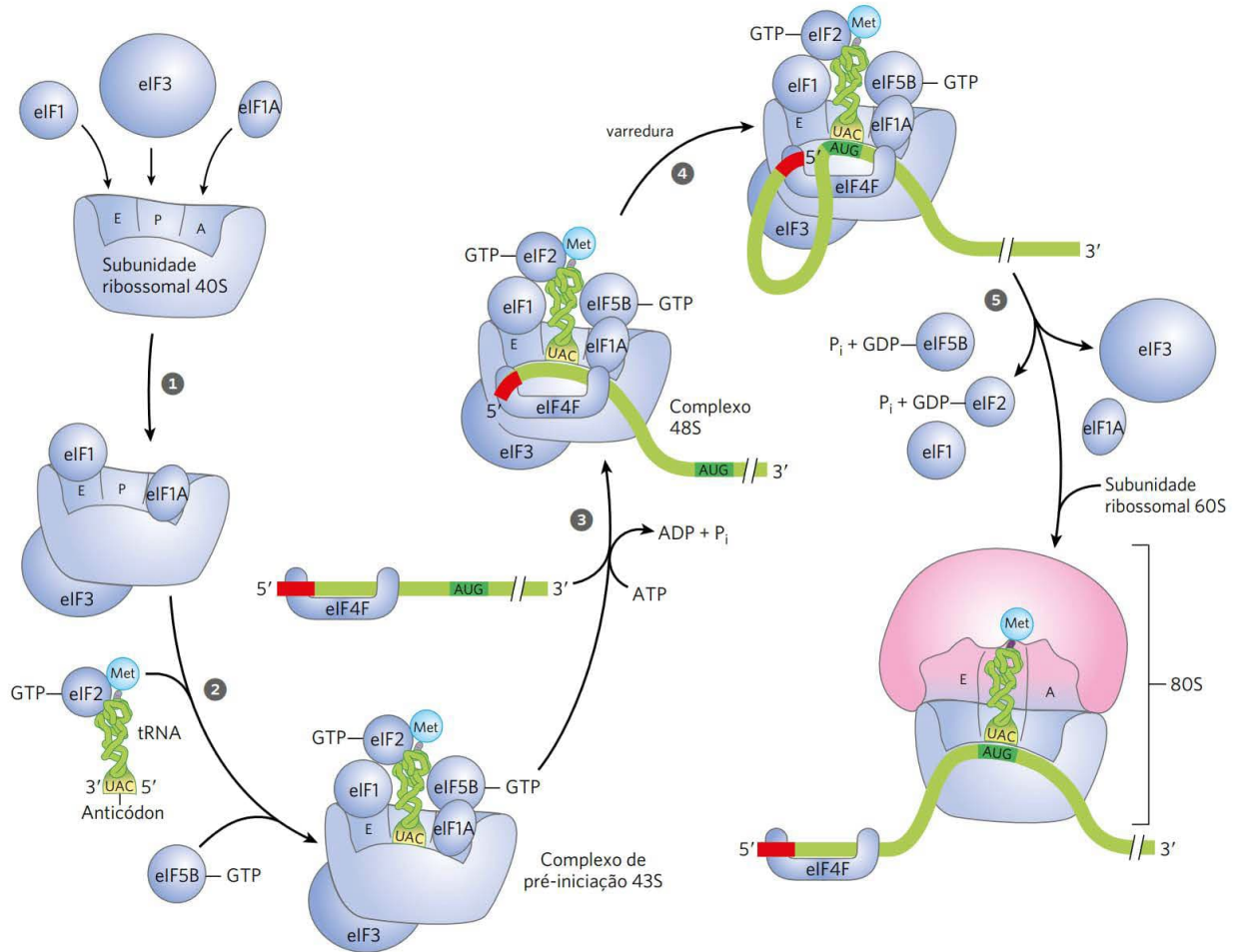


FIGURA 27-27 O início da síntese proteica em eucariotos. As cinco etapas são descritas no texto. Os fatores de iniciação dos organismos eucarióticos medeiam a associação primeiro do tRNA iniciador carregado para formar um complexo 43S e depois do mRNA (com o 5' cap mostrado em vermelho) para formar um complexo 48S. O complexo de iniciação 80S final é formado pela associação da subunidade 60S, acoplada com a liberação da maioria dos fatores de iniciação.

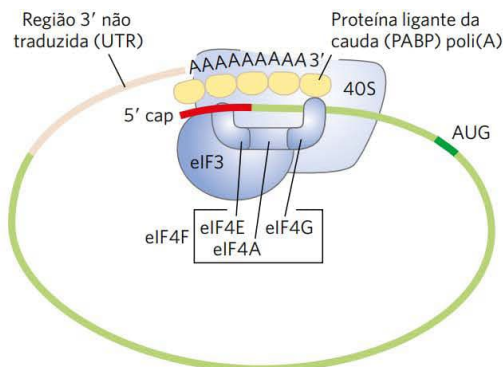


FIGURA 27-28 Circularização do mRNA no complexo de iniciação em eucariotos. As extremidades 3' e 5' dos mRNAs dos organismos eucarióticos são unidas pelo complexo proteico eIF4F. A subunidade eIF4E liga-se ao 5' cap, e a proteína eIF4G liga-se à proteína ligante da cauda poli(A) (PABP) na extremidade 3' do mRNA. A proteína eIF4G também se liga ao eIF3, unindo o mRNA circularizado à subunidade 40S do ribossomo.

leva à liberação de muitos dos fatores de iniciação. Isso requer a atividade de eIF5 e de eIF5B. A proteína eIF5 induz a atividade de GTPase do eIF2, produzindo um complexo eIF2-GDP com afinidade reduzida pelo tRNA iniciador. A proteína eIF5B é homóloga à IF2 de bactérias. Ela hidrolisa o GTP que está ligado a ela e dispara a dissociação do eIF2-GDP e outros fatores de iniciação, e, em seguida, ocorre a associação da subunidade 60S. Assim se completa a formação do complexo de iniciação.

Os papéis dos vários fatores de iniciação de bactérias e de eucariotos no processo como um todo estão resumidos na Tabela 27-8. O mecanismo pelo qual essas proteínas agem constitui uma importante área de pesquisa.

Etapa 3: as ligações peptídicas são formadas no estágio de alongamento

A terceira etapa da síntese proteica é o **alongamento**. Outra vez, primeiro serão analisadas as células bacterianas. O alongamento requer (1) o complexo de iniciação descrito anteriormente, (2) aminoacil-tRNA, (3) um conjunto de

TABELA 27-8 Fatores proteicos necessários para a iniciação da tradução em células bacterianas e eucarióticas

Fator	Função
Bactérias	
IF1	Impede a ligação prematura do tRNA no sítio A
IF2	Facilita a ligação do fMet-tRNA ^{fMet} à subunidade 30S do ribossomo
IF3	Liga-se à subunidade 30S; impede a associação prematura da subunidade 50S; aumenta a especificidade do sítio P pelo fMet-tRNA ^{fMet}
Eucariotos	
eIF1	Liga-se ao sítio E da subunidade 40S; facilita a interação entre o complexo ternário eIF2-tRNA-GTP e a subunidade 40S
eIF1A	Homólogo ao IF1 de bactérias; impede a ligação prematura do tRNA no sítio A
eIF2	GTPase; facilita a ligação do Met-tRNA ^{Met} iniciador à subunidade ribossômica 40S
eIF2B ^a , eIF3	Primeiros fatores a se ligarem na subunidade 40S; facilitam as etapas seguintes
eIF4F	Complexo que consiste em eIF4E, eIF4A e eIF4G
eIF4A	Atividade de RNA-helicase; remove estruturas secundárias do mRNA para permitir a ligação à subunidade 40S; faz parte do complexo eIF4F
eIF4B	Liga-se ao mRNA; facilita a varredura do mRNA para localizar o primeiro AUG
eIF4E	Liga-se ao 5' cap do mRNA; faz parte do complexo eIF4F
eIF4G	Liga-se ao eIF4E e à proteína ligante de poli(A) (PABP); faz parte do complexo eIF4F
eIF5 ^a	Promove a dissociação de vários outros fatores de iniciação da subunidade 40S antes que ocorra a associação desta com a subunidade 60S para formar o complexo de iniciação 80S
eIF5b	GTPase homóloga à IF2 bacteriana; responsável pela dissociação dos fatores de iniciação antes que o ribossomo se forme

^aNão mostrado na Figura 27-27.

três proteínas citosólicas solúveis, chamadas de **fatores de alongamento** (EF-Tu, EF-Ts e EF-G nas bactérias), e (4) GTP. As células realizam três etapas para adicionar cada resíduo de aminoácido, e essas etapas são repetidas enquanto houverem resíduos a ser adicionados.

Etapas 1 do alongamento: ligação de um aminoácil-tRNA Na primeira etapa do ciclo de alongamento (**Figura 27-29**), o

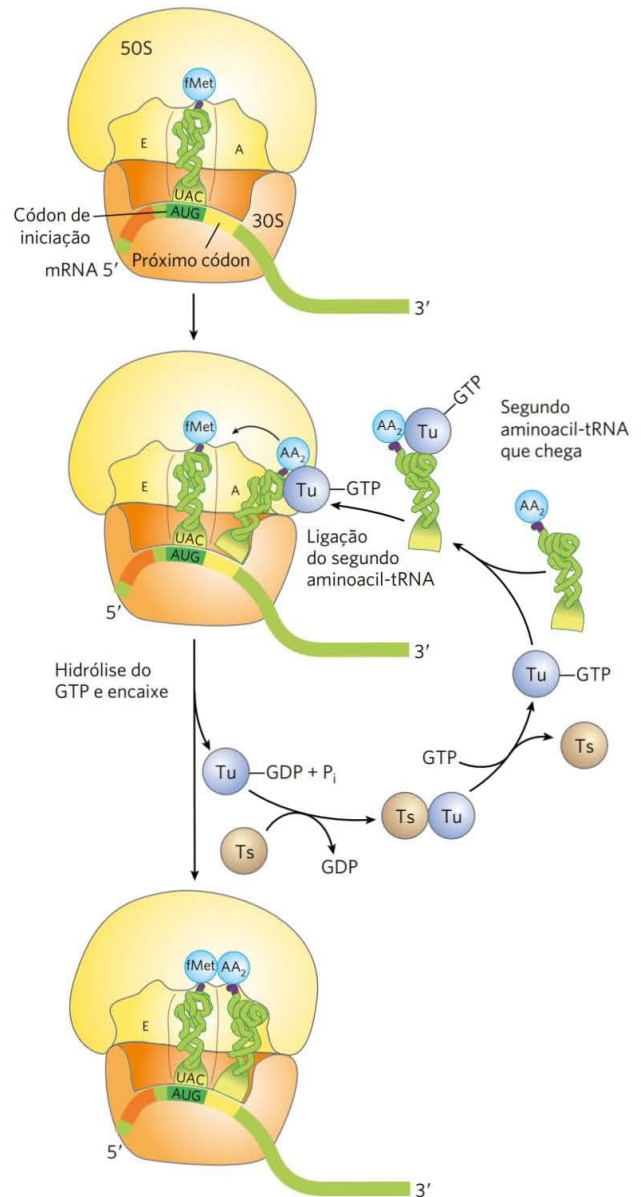


FIGURA 27-29 Primeira etapa do alongamento em bactérias: ligação do segundo aminoácil-tRNA. O segundo aminoácil-tRNA (AA₂) entra no sítio A do ribossomo ligado a EF-Tu, que está ligado a GTP (mostrado aqui como Tu). A ligação do segundo aminoácil-tRNA ao sítio A é acompanhada pela hidrólise de GTP a GDP e P_i e pela liberação do complexo EF-Tu-GDP do ribossomo. O GDP ligado é liberado quando o complexo EF-Tu-GDP se liga ao EF-Ts, e o EF-Ts depois é liberado quando outra molécula de GTP se liga a EF-Tu. Isso recicla o EF-Tu, deixando-o disponível para repetir o ciclo. A "acomodação" envolve mudanças na conformação do segundo tRNA que puxa sua extremidade aminoacila para o sítio da peptidil-transferase.

aminoácil-tRNA apropriado que entra se liga a um complexo que consiste em EF-Tu ligado a GTP. O complexo aminoácil-tRNA-EF-Tu-GTP resultante se liga ao sítio A do complexo de iniciação 70S. O GTP é hidrolisado, e um com-

plexo EF-Tu-GDP é liberado do ribossomo 70S. O complexo EF-Tu-GTP é regenerado durante um processo envolvendo EF-Ts e GTP.

Etapa 2 do alongamento: formação da ligação peptídica Agora, uma ligação peptídica é formada entre os dois aminoácidos ligados, por meio dos seus tRNA, aos sítios A e P no ribossomo. Isso ocorre por meio da transferência do grupo *N*-formilmetionil do tRNA iniciador para o grupo amina do segundo aminoácido, agora no sítio A (**Figura 27-30**). O grupo α -amina do aminoácido no sítio A age como um nucleófilo, deslocando o tRNA do sítio P para formar a ligação peptídica. Essa reação produz um dipeptidil-tRNA no sítio A, e o tRNA^{fMet} “não carregado” (desacilado) permanece ligado ao sítio P. Os tRNA mudam, então, para um estado híbrido de ligação, com elementos de cada um deles estendendo-se sobre dois sítios diferentes no ribossomo, como mostrado na Figura 27-30.

A atividade enzimática que catalisa a formação da ligação peptídica tem sido historicamente chamada de **peptidil-transferase**, e era considerada intrínseca a uma ou mais proteínas da subunidade maior do ribossomo. Agora, sabe-se que essa reação é catalisada pelo rRNA 23S, adicionando mais um membro para o repertório catalítico das ribozimas. Essa descoberta trouxe implicações muito

interessantes para o conhecimento da evolução da vida (Capítulo 26).

Etapa 3 do alongamento: translocação Na etapa final do ciclo de alongamento, a **translocação**, o ribossomo move um códon em direção à extremidade 3' do mRNA (**Figura 27-31a**). Esse movimento move o anticódon do dipeptidil-tRNA, o qual ainda está preso ao segundo códon do mRNA, do sítio A para o sítio P, e move o tRNA desacilado do sítio P para o sítio E, a partir do qual o tRNA é liberado para o citosol. O terceiro códon do mRNA se encontra agora no sítio A, e o segundo códon, no sítio P. O movimento do ribossomo ao longo do mRNA requer o fator EF-G (também conhecido como translocase) e a energia fornecida pela hidrólise de outra molécula de GTP. Uma mudança na conformação tridimensional de todo o ribossomo resulta no movimento deste ao longo do mRNA. Como a estrutura do EF-G se assemelha à estrutura do complexo EF-Tu-tRNA (Figura 27-31b), o EF-G é capaz de se ligar ao sítio A e, supõem-se, deslocar o peptidil-tRNA.

Após a translocação, o ribossomo, com o dipeptidil-tRNA e o mRNA ligados, está pronto para um novo ciclo de alongamento e para a ligação de um terceiro resíduo de aminoácido. Esse processo ocorre da mesma forma que a adição do segundo resíduo (como mostrado nas Figuras

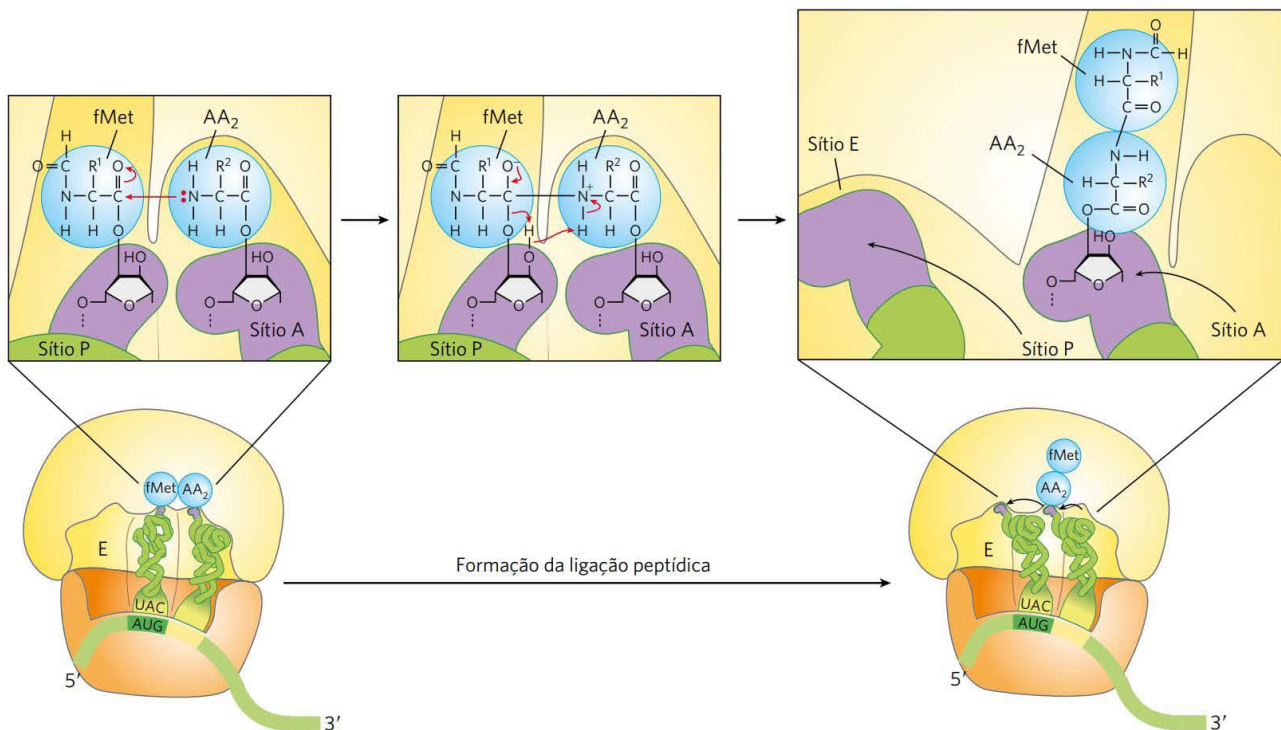
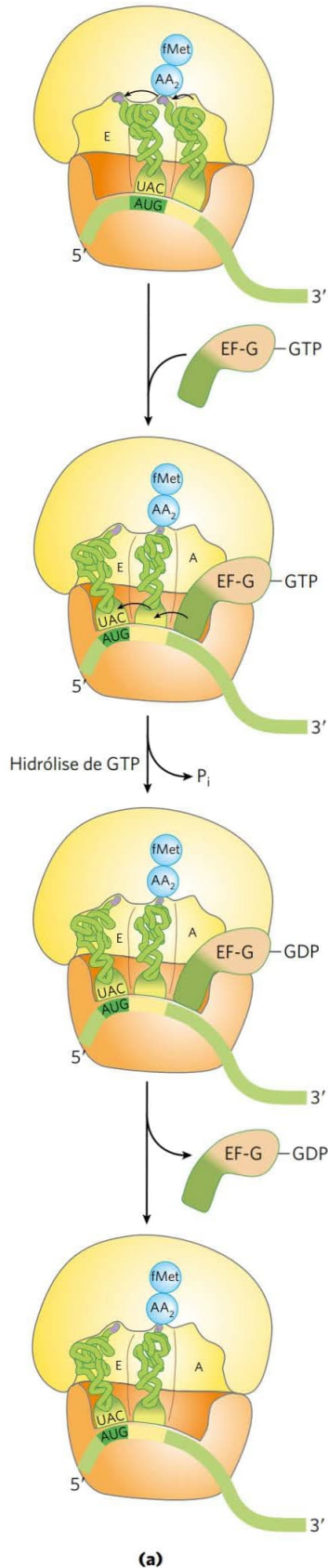


FIGURA 27-30 Segunda etapa do alongamento em bactérias: formação da primeira ligação peptídica. A peptidil-transferase que catalisa essa reação é a ribozima rRNA 23S. O grupo *N*-formilmetionil é transferido para o grupo amina do segundo aminoácido-tRNA no sítio A, formando um dipeptidil-tRNA. Nesse estágio, ambos os tRNA ligados ao ribossomo mudam de posição na subunidade 50S, adotando um estado híbrido de ligação. O tRNA não carregado se desloca de modo que suas extremidades 3' e 5' fiquem no sítio E. De forma semelhante, as extremidades 3' e 5' do dipeptidil-tRNA se deslocam para o sítio P. Os anticódons permanecem nos sítios P e A. Observe que o grupamento 2'-hidroxila da adenosina da extremidade 3' atua como um catalisador acidobásico geral nesta reação.

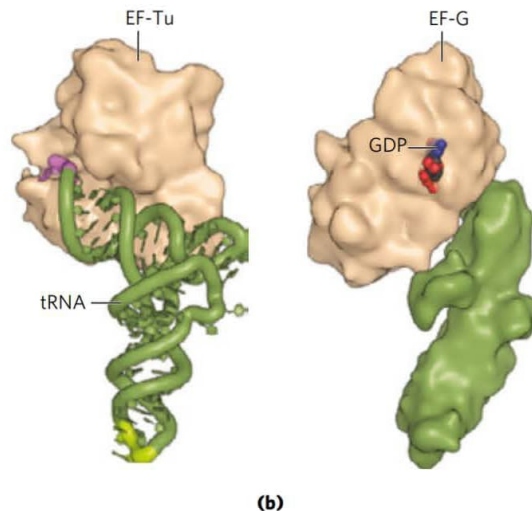


27-29, 27-30 e 27-31). Para cada resíduo de aminoácido corretamente adicionado ao polipeptídeo nascente, dois GTP são hidrolisados a GDP e P_i, à medida que o ribossomo se move códon a códon ao longo do mRNA em direção à extremidade 3'.

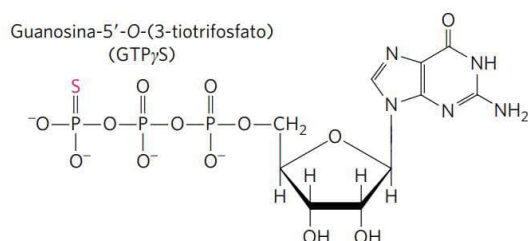
O polipeptídeo permanece ligado ao tRNA do último (mais recentemente) aminoácido inserido. Essa associação mantém a conexão funcional entre a informação contida no mRNA e a produção do polipeptídeo decodificado. Ao mesmo tempo, a ligação éster entre esse tRNA e a extremidade carboxila do polipeptídeo nascente ativa o grupo carboxiterminal para o ataque nucleofílico pelo aminoácido que chega para formar uma nova ligação peptídica (Figura 27-30). À medida que a ligação éster existente entre o polipeptídeo e o tRNA é quebrada durante a formação da ligação peptídica, a ligação entre o polipeptídeo e a informação contida no mRNA persiste, pois cada novo aminoácido adicionado permanece preso ao seu tRNA.

O ciclo de alongamento nos organismos eucarióticos é semelhante ao ciclo nas bactérias. Três fatores de alongamento eucarióticos (eEF1α, eEF1βγ e eEF2) têm funções análogas àsquelas dos fatores de alongamento bacterianos (EF-Tu, EF-Ts e EF-G, respectivamente). Quando um novo aminoacil-tRNA se liga ao sítio A, uma interação alostérica faz a expulsão do tRNA não carregado do sítio E.

FIGURA 27-31 Terceira etapa do alongamento em bactérias: translocação. (a) O ribossomo desloca um códon em direção à extremidade 3' do mRNA, utilizando a energia proveniente da hidrólise do GTP ligado ao fator EF-G (translocase). O dipeptidil-tRNA está agora completamente no sítio P, deixando o sítio A aberto para a entrada do próximo (terceiro) aminoacil-tRNA. O tRNA não carregado se dissocia do sítio E, e o ciclo de alongamento inicia novamente. (b) A estrutura do EF-G se assemelha à estrutura do EF-Tu complexado com tRNA. Aqui, estão mostrados EF-Tu complexado com tRNA (à esquerda) e EF-G complexado com GDP (à direita). A região carboxiterminal do EF-G é semelhante à alça do anticódon do tRNA, tanto em forma como em distribuição de cargas. [Fontes: (b) (à esquerda) PDB ID 1B23, P. Nissen et al., *Structure* 7:143, 1999; (à direita) PDB ID 1DAR, S. al-Karadaghi et al., *Structure* 4:555, 1996.]



Revisão no ribossomo A atividade GTPásica do EF-Tu durante a primeira etapa do alongamento em células bacterianas (Figura 27-29) contribui de maneira importante para a velocidade e a fidelidade de todo o processo biossintético. Tanto o complexo EF-Tu-GTP como o EF-Tu-GDP existem por poucos milissegundos antes de se dissociarem. Esses períodos constituem oportunidades para que ocorra uma leitura para revisão das interações códon-anticódon. Os aminoacil-tRNA incorretos normalmente se dissociam do sítio A em um desses momentos. Se o análogo de GTP, guanosina-5'-O-(3-tiotrifosfato) (GTP γ S), for utilizado no lugar do GTP, a hidrólise se torna mais lenta, melhorando a fidelidade (aumentando os intervalos de revisão), mas reduzindo a velocidade da síntese proteica.



O processo de síntese proteica (incluindo as características do pareamento códon-anticódon já descritas) foi claramente otimizado ao longo da evolução, de forma a equili-

brar as exigências de rapidez e fidelidade. Maior fidelidade diminui a velocidade, ao passo que aumentos na velocidade possivelmente comprometeriam a fidelidade. Lembre-se de que o mecanismo de revisão no ribossomo estabelece apenas que ocorreu pareamento apropriado entre códon e anticódon e não verifica se o aminoácido correto está ligado ao tRNA. Se um tRNA for aminoacilado com sucesso com um aminoácido errado (o que se pode fazer experimentalmente), esse aminoácido incorreto é incorporado à proteína com eficiência em resposta ao códon reconhecido normalmente por aquele tRNA.

Etapa 4: a terminação da síntese de polipeptídeos necessita de um sinal especial

O alongamento continua até que o ribossomo adicione o último aminoácido codificado pelo mRNA. A **terminação**, quarta etapa da síntese de polipeptídeos, é sinalizada pela presença de um dos três códons de término no mRNA (UAA, UAG, UGA), imediatamente após o último aminoácido codificado. Mutações no anticódon do tRNA que permitem que um aminoácido seja inserido em um códon de término são geralmente deletérias para a célula (Quadro 27-3). Em bactérias, uma vez que um códon de término tenha ocupado o sítio A do ribossomo, três **fatores de terminação** ou **fatores de liberação** – as proteínas RF1, RF2 e RF3 – contribuem para (1) hidrólise da ligação peptídil-tRNA

QUADRO 27-3 Variação induzida no código genético: supressão sem sentido

Quando uma mutação produz um códon de término no interior de um gene, a tradução é prematuramente interrompida, e o polipeptídeo incompleto é, geralmente, inativo. Essas mutações são chamadas de mutações sem sentido. O gene pode ter sua função normal recuperada se uma segunda mutação (1) converter o códon de terminação resultante da primeira mutação em um códon que especifique um aminoácido ou (2) suprimir os efeitos do códon de término. Essas mutações restauradoras são chamadas de **supressores sem sentido**; elas geralmente envolvem mutações em genes de tRNA e produzem tRNAs alterados (supressores) capazes de reconhecer o códon de término e inserir um aminoácido naquela posição. A maioria dos tRNA supressores conhecidos apresentam substituições de uma única base nos seus anticódons.

Os tRNA supressores constituem uma variação experimentalmente induzida do código genético para permitir a leitura de códons que são, geralmente, de término, de forma bem parecida com as variações de código que ocorrem naturalmente, conforme descrito no Quadro 27-1. A supressão sem sentido não quebra totalmente a transferência normal de informação na célula, pois a célula geralmente tem várias cópias de cada gene de tRNA; alguns desses genes duplicados são pouco expressos e contribuem apenas para uma pequena fração do conjunto de um determinado tRNA na célula. As mutações supressoras, em geral, envolvem um tRNA “menos importante”, deixando os tRNA principais para que o códon seja lido normalmente.

Por exemplo, a *E. coli* tem três genes idênticos para tRNA^{Tyr}, sendo que cada um produz um tRNA com o anticódon (5')GUA. Um desses genes é expresso em níveis relativamente altos, e, portanto, o seu produto representa a principal proporção de tRNA^{Tyr}; os outros dois genes são transcritos em quantidades pequenas. Uma mudança no anticódon do tRNA produzido a partir de um desses dois genes de tRNA^{Tyr}, de (5')GUA para (5')CUA, produz, em baixas quantidades, um tipo de tRNA^{Tyr} que inserirá tirosina em códons de término UAG. Essa inserção de tirosina em UAG é realizada de modo pouco eficiente, mas pode produzir quantidades suficientes da proteína inteira, a partir de um gene com mutação sem sentido, de modo a permitir que a célula sobreviva. O tRNA^{Tyr} majoritário continua traduzindo o código genético normalmente para a maioria das proteínas.

A mutação que leva à geração de um tRNA supressor nem sempre ocorre no anticódon. A supressão de códons UGA sem sentido geralmente envolve o tRNA^{Trp}, que reconhece, normalmente, UGG. A alteração que permite que esse tRNA leia UGA (e insira resíduos de Trp nessas posições) é uma mudança de G para A na posição 24 (em um braço do tRNA ligeiramente afastado do anticódon), e, com essa alteração, esse tRNA pode agora reconhecer *tanto* UGG *como* UGA. Uma mudança semelhante é encontrada em tRNA envolvidos na variação no código genético mais comumente encontrada na natureza (UGA = Trp; ver Quadro 27-1).

terminal; (2) liberação do polipeptídeo e a liberação do último tRNA, agora não carregado, do sítio P; e (3) dissociação do ribossomo 70S em suas subunidades 30S e 50S, prontas para começar um novo ciclo de síntese de polipeptídeo (**Figura 27-32**). O RF1 reconhece os códons de terminação UAG e UAA, e o RF2 reconhece UGA e UAA. O RF1 ou o RF2 (dependendo do códon presente) se liga a um códon de término e induz a peptidil-transferase a transferir o polipeptídeo nascente para uma molécula de água, em vez de para outro aminoácido. Os fatores de liberação têm domínios que parecem se assemelhar à estrutura do tRNA, como mostrado para o fator de alongamento EF-G na Figura 27-31b. A função específica do RF3 ainda não foi definitivamente estabelecida, mas pensa-se que ele libera a subunidade ribossômica. Em eucariotos, um único fator de liberação, o eRF, reconhece todos os três códons de término.

A reciclagem do ribossomo leva à dissociação dos componentes envolvidos na tradução. Os fatores de liberação se dissociam do complexo resultante da terminação (com um tRNA não carregado no sítio P) e são substituídos por EF-G e por uma proteína denominada fator de reciclagem do ribossomo (RRF, do inglês, *ribosome recycling factor*; *M*, 20.300). A hidrólise de GTP por EF-G leva à dissociação da subunidade de 50S, que se separa do complexo 30S tRNA-mRNA. O EF-G e o RRF são substituídos por IF3, o qual promove a dissociação do tRNA. O mRNA é, então, liberado. O complexo formado entre IF3 e a subunidade 30S está, então, pronto para iniciar outro ciclo de síntese proteica (**Figura 27-25**).

Resgate do ribossomo Os ribossomos podem parar durante a biossíntese de uma proteína, principalmente quando traduzindo um mRNA danificado ou incompleto. Quando o ribossomo chega no final de um mRNA antes de encontrar um códon de terminação, a etapa de translocação leva à formação de um “complexo de não terminação” estável, no qual o sítio A não tem mRNA para interagir com um novo tRNA carregado. O complexo de não terminação não pode ser reciclado pelos fatores de terminação normais. Em vez disso, o ribossomo é resgatado por um processo denominado tradução *trans* (**Figura 27-33**). Em praticamente todas as bactérias, o sistema de resgate consiste em um RNA denominado RNA mensageiro e de transferência (tmRNA) e uma proteína muito pequena, a proteína pequena B (SmpB). Eles se ligam ao complexo parado, de forma que o tmRNA fica posicionado no sítio A vazio, e, assim, o ribossomo pode continuar a tradução até encontrar o códon de terminação que está embutido no tmRNA. O ribossomo é, portanto, reciclado, e tanto o mRNA defeituoso quanto o peptídeo traduzido a partir dele são degradados. Nos organismos eucarióticos existe um sistema semelhante a esse.

Custo energético da fidelidade na síntese proteica A síntese fidedigna de uma proteína em relação à informação presente no seu mRNA necessita de energia. A formação de cada aminoacil-tRNA consome dois grupos fosfato de alta energia. Um ATP adicional é consumido cada vez que um aminoácido incorretamente ativado é hidrolisado pela atividade de desacilase das aminoacil-tRNA-sintetases, como parte da atividade de revisão. Um GTP é clivado em GDP e P_i durante a primeira etapa de alongamento, e outro durante a etapa de translocação. Assim, para a formação de cada uma das ligações peptídicas de um polipeptídeo é necessária, em média, a energia derivada da hidrólise de mais de quatro NTP gerando NDP.

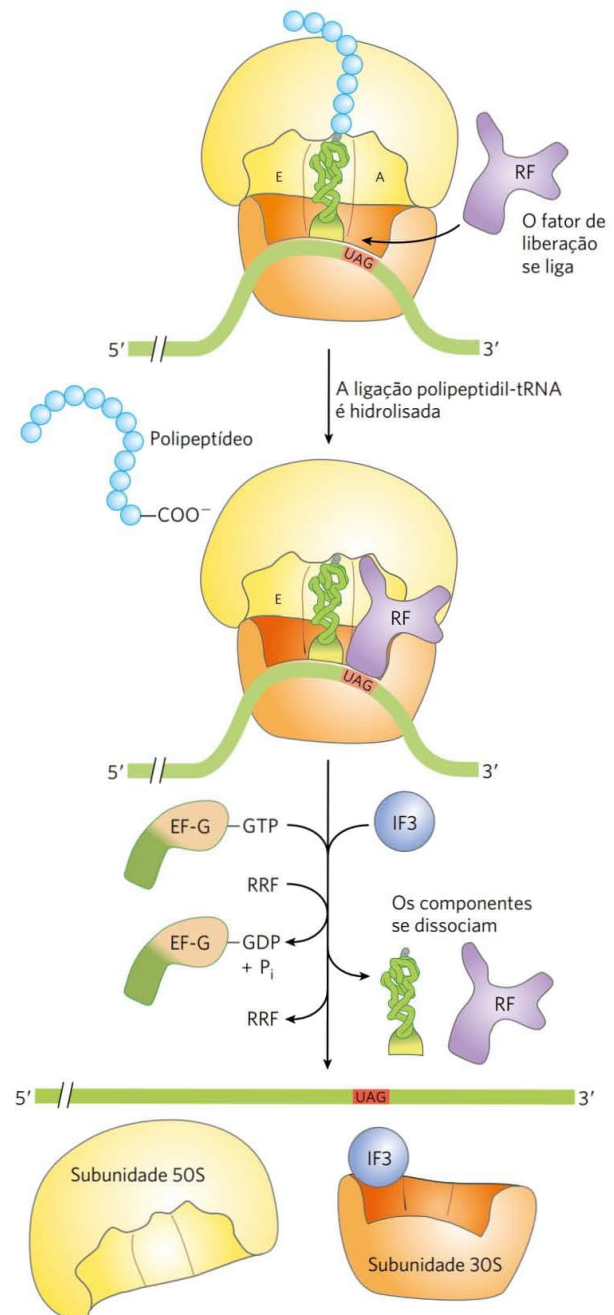


FIGURA 27-32 Terminação da síntese de proteínas em bactérias.

A síntese é terminada em resposta a um códon de terminação no sítio A. Primeiro, um fator de liberação, RF (RF1 ou RF2, dependendo do códon de término presente), liga-se ao sítio A. Isso causa a hidrólise da ligação éster entre o polipeptídeo nascente e o tRNA no sítio P e a liberação do polipeptídeo completo. Por fim, o mRNA, o tRNA desacilado e o fator de liberação saem do ribossomo, o qual se dissocia em suas subunidades 30S e 50S, auxiliado pelo fator de reciclagem do ribossomo (RRF), pelo IF3 e pela energia fornecida pela hidrólise de GTP mediada por EF-G. O complexo formado pela subunidade 30S e pelo IF3 está pronto para iniciar um outro ciclo de tradução (ver Figura 27-25).

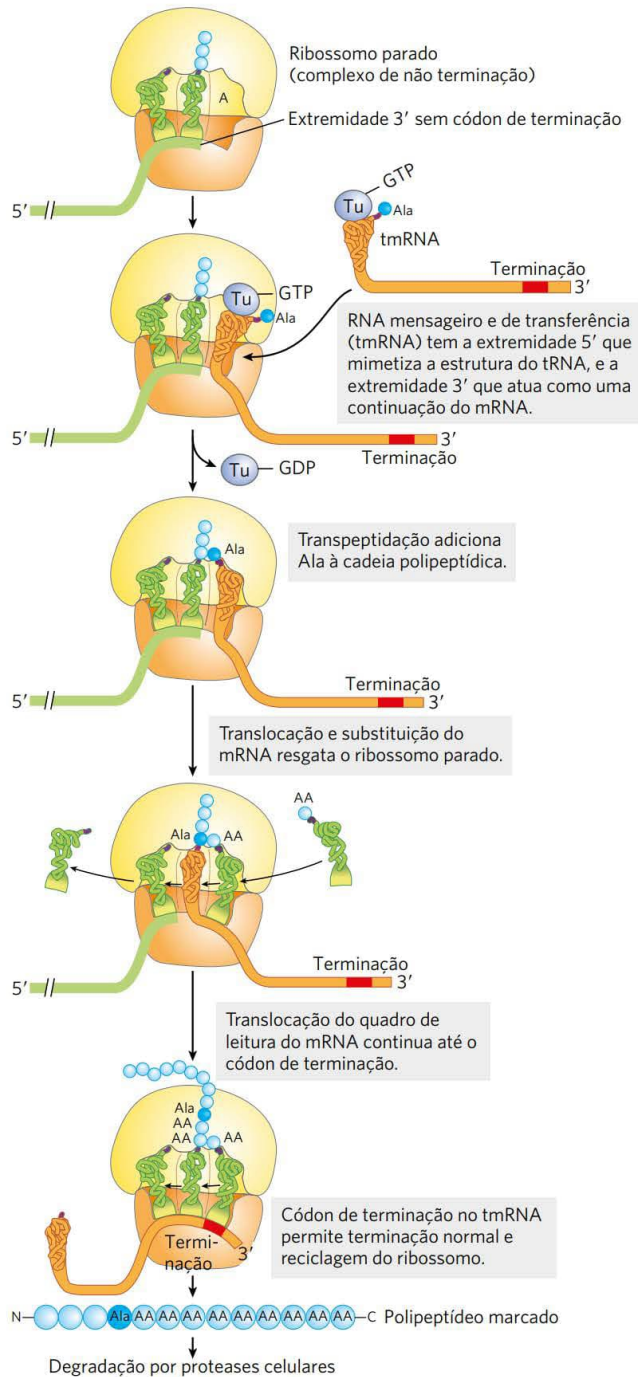


FIGURA 27-33 Resgate de ribossomos bacterianos parados pelo tmRNA. Nas bactérias, tmRNA resgata ribossomos parados por mimetizar tanto tRNA quanto mRNA. Uma via de muitas etapas permite a liberação e a degradação do mRNA danificado e marca o polipeptídeo truncado para degradação.

Isso representa um “empurrão” termodinâmico excessivamente grande na direção da síntese: pelo menos $4 \times 30,5 \text{ kJ/mol} = 122 \text{ kJ/mol}$ de energia da ligação fosfodiéster para gerar uma ligação peptídica, a qual tem uma energia livre padrão de hidrólise de apenas aproximadamente -21 kJ/mol . A variação de energia livre durante a síntese

de uma ligação peptídica, portanto, tem valor líquido de -101 kJ/mol . As proteínas são polímeros que contêm informação. O objetivo bioquímico não é apenas a formação de uma ligação peptídica, mas a formação de uma ligação peptídica entre dois aminoácidos *específicos*. Cada um dos compostos fosfatados altamente energéticos gastos nesse processo tem papel fundamental na manutenção do alinhamento correto entre cada novo códon no mRNA e o respectivo aminoácido na extremidade do polipeptídeo que está crescendo. Essa energia permite uma altíssima fidelidade na tradução biológica da mensagem genética do mRNA para a sequência de aminoácidos das proteínas.

Tradução rápida de uma única mensagem por polissomos Grandes conjuntos de 10 a 100 ribossomos muito ativos na síntese proteica podem ser isolados de células eucarióticas e bacterianas. Micrografias eletrônicas mostram a presença de uma fibra entre ribossomos adjacentes em um conjunto, chamada de **polissomo** (Figura 27-34a). A fita conectora

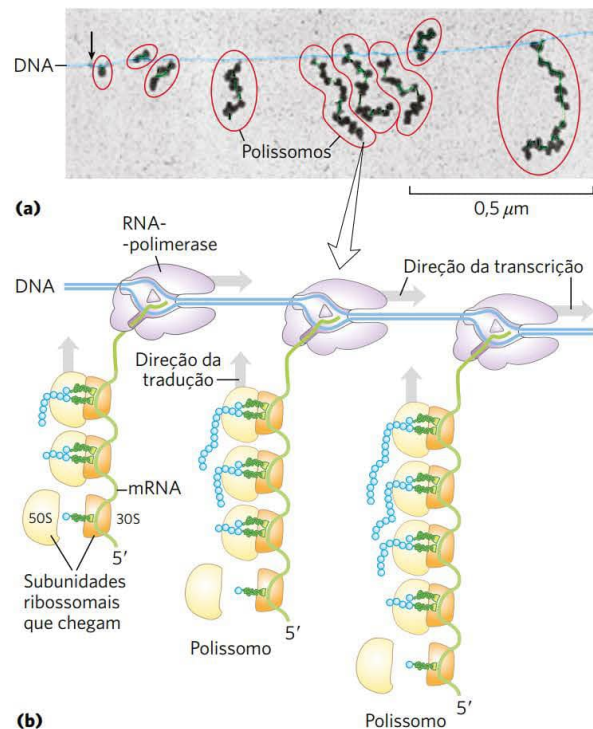


FIGURA 27-34 Acoplamento da transcrição e da tradução em bactérias. (a) Micrografia eletrônica de polissomos formados durante a transcrição de um segmento do DNA de *E. coli*. Cada molécula de mRNA está sendo traduzida por muitos ribossomos simultaneamente. As cadeias polipeptídicas nascentes são formadas nos ribossomos são difíceis de visualizar sob as condições usadas na preparação de amostras mostradas nesta micrografia. A seta aponta o local aproximado do início do gene que está sendo transcrito. (b) Cada mRNA é traduzido pelos ribossomos enquanto ainda está sendo transcrito do DNA pela RNA-polimerase. Isso é possível porque, em bactérias, o mRNA não precisa ser transportado do núcleo para o citoplasma para que encontre os ribossomos. Neste diagrama, os ribossomos estão mostrados em tamanho menor do que a RNA-polimerase. Na realidade, os ribossomos ($M_r 2,7 \times 10^6$) são uma ordem de grandeza maiores do que a RNA-polimerase ($M_r 3,9 \times 10^5$). [Fonte: (a) O. L. Miller, Jr., et al. *Science* 169:392, 1970, Fig. 3. © 1970 American Association for the Advancement of Science.]

é uma única molécula de mRNA que está sendo traduzida simultaneamente por ribossomos muito próximos uns dos outros, permitindo um uso altamente eficiente do mRNA.

Em bactérias, a transcrição e a tradução são processos estreitamente acoplados. Os RNA mensageiros são sintetizados e traduzidos na mesma direção, 5'→3'. Os ribossomos começam a traduzir a extremidade 5' do mRNA antes que a transcrição se complete (Figura 27-34b). A situação é um tanto diferente em células eucarióticas, nas quais os mRNA recém-sintetizados precisam deixar o núcleo antes que possam ser traduzidos.

Em geral, os mRNA bacterianos existem por apenas alguns minutos (p. 1062) antes de serem degradados por nucleases. Para manter altas taxas de síntese proteica, o mRNA para uma dada proteína ou grupo de proteínas precisa ser sintetizado continuamente e traduzido com eficiência máxima. O curto tempo de vida dos mRNA nas bactérias permite a parada rápida da síntese quando a proteína não é mais necessária.

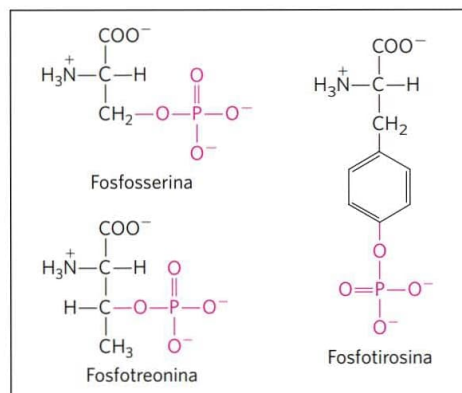
Etapas 5: as cadeias polipeptídicas recém-sintetizadas passam por enovelamento e processamento

Na etapa final da síntese proteica, a cadeia polipeptídica nascente é enovelada e processada, adquirindo a forma biologicamente ativa. Durante ou após a síntese, o polipeptídeo adquire progressivamente a sua conformação nativa, com a formação de ligações de hidrogênio e interações de van der Waals apropriadas, interações iônicas e por meio do efeito hidrofóbico. As proteínas chaperonas (Capítulo 4) têm um papel importante no enovelamento correto que ocorre nas células. Algumas proteínas recém-sintetizadas, sejam elas de bactérias, de arqueias ou de eucariotos, não adquirem a conformação final biologicamente ativa até que sejam alteradas por uma ou mais reações de processamento, denominadas **modificações pós-traducionais**.

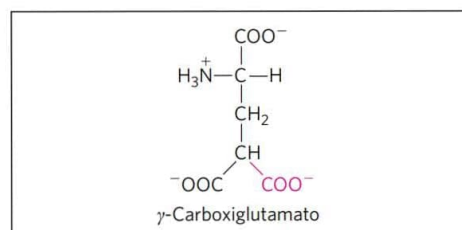
Modificações aminoterminais e carboxiterminais O primeiro resíduo inserido em todos os polipeptídeos é a *N*-formilmetionina (em bactérias) ou metionina (em eucariotos). Entretanto, o grupo formil, o resíduo Met aminoterminal e, frequentemente, mais resíduos da região aminoterminal (e, em alguns casos, da extremidade carboxilica) podem ser removidos enzimaticamente para a formação da proteína funcional final. Em até 50% das proteínas eucarióticas, o grupamento amino do resíduo aminoterminal é *N*-acetilado após a tradução. Às vezes, resíduos carboxiterminais são também modificados.

Perda das sequências sinalizadoras Como será visto na Seção 27.3, 15 a 30 resíduos da extremidade aminoterminal de algumas proteínas têm papel no endereçamento da proteína para seu destino final na célula. Essas **sequências sinalizadoras** são removidas no final por peptidases específicas.

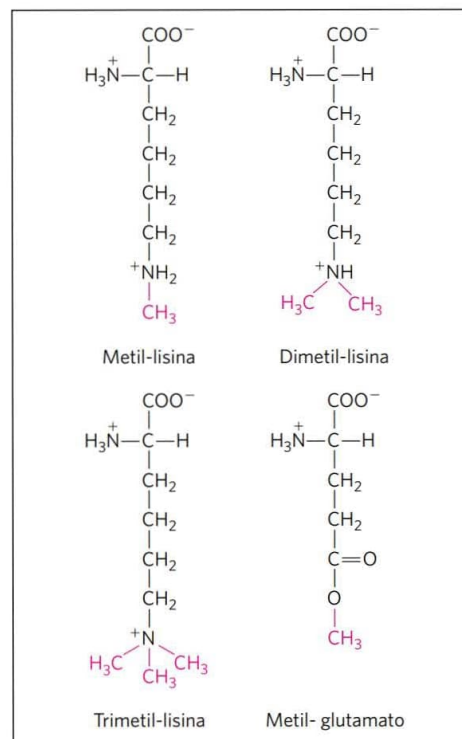
Modificação de resíduos individuais de aminoácidos Os grupos hidroxila de certos resíduos Ser, Thr e Tyr de algumas proteínas são fosforilados enzimaticamente por ATP (**Figura 27-35a**); os grupos fosfato adicionam cargas negativas a esses polipeptídeos. O significado funcional dessa modificação varia de uma proteína para outra. Por exemplo, a proteína caseína do leite tem muitos grupos de fosfoserina



(a)



(b)



(c)

FIGURA 27-35 Alguns resíduos de aminoácidos modificados. (a) Aminoácidos fosforilados. (b) Um aminoácido carboxilado. (c) Alguns aminoácidos metilados.

que ligam Ca^{2+} . Cálcio, fosfato e aminoácidos são elementos valiosos para lactentes; a caseína fornece, assim, três nutrientes essenciais. E, como foi visto em vários exemplos, os ciclos de fosforilação-desfosforilação regulam a atividade de muitas enzimas e proteínas regulatórias.

Grupos carboxila extras podem ser adicionados a resíduos Glu de algumas proteínas. Por exemplo, a protrombina, uma proteína da coagulação do sangue, contém resíduos γ -carboxiglutamato (Figura 27-35b) na região aminoterminal; os grupos γ -carboxila são introduzidos por uma enzima que necessita de vitamina K. Esses grupos carboxila ligam Ca^{2+} , o qual é necessário para iniciar o mecanismo de coagulação.

Resíduos de monometil-lisina e dimetil-lisina (Figura 27-35c) ocorrem em algumas proteínas musculares e no citocromo *c*. A calmodulina da maioria dos organismos contém um resíduo de trimetil-lisina em uma posição específica. Em outras proteínas, os grupos carboxilas de alguns resíduos Glu sofrem metilação, que remove suas cargas negativas.

Ligação de cadeias laterais de carboidratos As cadeias laterais de carboidratos das glicoproteínas são ligadas covalentemente durante ou após a síntese do polipeptídeo. Em algumas glicoproteínas, a cadeia lateral de carboidrato é ligada enzimaticamente a resíduos Asn (oligossacarídeos *N*-ligados); em outras, a resíduos Ser ou Thr (oligossacarídeos *O*-ligados) (ver Figura 7-30). Muitas proteínas com função extracelular, bem como os proteoglicanos lubrificantes que revestem as membranas mucosas, contêm cadeias laterais de oligossacarídeos (ver Figura 7-28).

Adição de grupos isoprenila Algumas proteínas de organismos eucarióticos são modificadas pela adição de grupos derivados do isopreno (grupos isoprenila). Uma ligação tioéter é formada entre o grupo isoprenila e um resíduo Cys da proteína (ver Figura 11-13). Os grupos isoprenila são derivados de intermediários pirofosforilados da via de biossíntese do colesterol (ver Figura 21-35), como o farnesil-pirofosfato (Figura 27-36). Proteínas modificadas dessa forma incluem as proteínas Ras (pequenas proteínas G), que são produtos de proto-oncogenes e oncogenes *ras*, as proteínas G triméricas (ambas discutidas no Capítulo 12), bem como as laminas, proteínas encontradas na matriz nuclear. O grupo isoprenila ajuda a ancorar a proteína na membrana. A atividade transformadora (carcinogênica) do oncogene *ras* é perdida quando a isoprenilação da proteína Ras é bloqueada, uma descoberta que tem estimulado interesse na identificação de inibidores dessa via de modificação pós-traducional para o uso na quimioterapia do câncer.

Adição de grupos prostéticos Muitas proteínas necessitam da ligação de grupos prostéticos para sua atividade. Dois exemplos são a molécula de biotina da acetil-CoA-carboxilase e o grupo heme da hemoglobina ou do citocromo *c*.

Processamento proteolítico Muitas proteínas são sintetizadas inicialmente como polipeptídeos precursores longos e inativos, os quais são clivados proteoliticamente para dar origem às formas menores e ativas das proteínas. Os exemplos incluem a pró-insulina, algumas proteínas virais e proteases, como o quimotripsinogênio e o tripsinogênio (ver Figura 6-39).

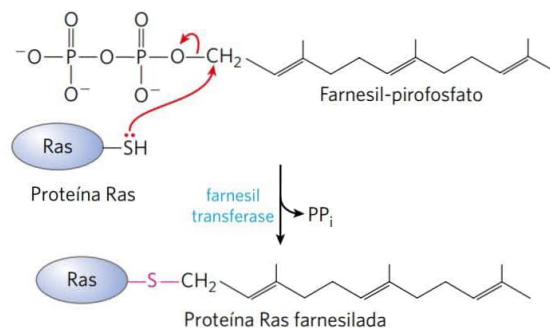


FIGURA 27-36 Farnesilação de um resíduo Cys. A ligação tioéter é mostrada em vermelho. A proteína Ras é o produto do oncogene *ras*.

Formação de ligações dissulfeto Após se enovelarem em suas conformações nativas, algumas proteínas formam ligações dissulfeto entre resíduos de Cys presentes em uma mesma cadeia ou em cadeias diferentes. Nos eucariotos, as ligações dissulfeto são comuns em proteínas secretadas das células. As ligações assim formadas ajudam a proteger a conformação nativa da molécula proteica da desnaturação no meio extracelular, que é geralmente oxidante e cujas condições podem ser bem diferentes daquelas do meio intracelular.

O perfil ribossômico fornece uma visão instantânea da tradução nas células

Métodos modernos de sequenciamento de DNA podem ser aplicados de várias maneiras criativas que permitem que os pesquisadores estudem as vias de informação. Uma dessas aplicações, chamada de **perfil ribossômico**, é capaz de identificar as sequências de mRNA que estão sendo traduzidas em determinado momento na célula (Figura 27-37). Os cientistas coletam as células dos tecidos e rapidamente isolam os ribossomos, com seu respectivo mRNA ainda ligado. As ribonucleases são usadas para remover qualquer RNA que não esteja ligado aos ribossomos, e o RNA ligado e protegido pelos ribossomos é, então, isolado. Esse RNA é convertido em DNA com o uso de uma transcriptase reversa (ver Capítulo 26) e, então, submetido ao sequenciamento completo (p. 310). As sequências obtidas revelam não apenas as partes dos genes que estão sendo traduzidas em determinado momento, mas o número de leituras de cada segmento indica a proporção relativa com que esses segmentos estão sendo traduzidos. Por exemplo, todas as oito subunidades diferentes da F_0F_1 -ATPase bacteriana (ver Figura 19-25) são codificados em um único óperon e traduzidas de um único mRNA policistônico. Pode-se supor, então, que todas as subunidades da proteína, traduzidas desse mRNA, seriam sintetizadas em quantidades semelhantes. Entretanto, no complexo final, as subunidades não estão presentes em números iguais; a F_0F_1 -ATPase tem 10 subunidades α , 3 de cada subunidades β e γ , e 1 ou 2 das demais subunidades. O perfil ribossômico mostra que os oito genes do mRNA são traduzidos em uma relação de 1:1:1:1:2:3:3:10. A tradução de cada gene é assim ajustada para produzir as quantidades de cada subunidade que correspondem exatamente à mesma relação entre as subunidades no complexo final. Resultados semelhantes foram obtidos para diferentes

Vários outros inibidores da síntese proteica são notáveis devido à toxicidade para os seres humanos e outros mamíferos. A **toxina diftérica** (M_r 58.330) catalisa a ADP-ribosilação de um resíduo de diftamida (histidina mo-

dificada) do fator de alongamento eucariótico eEF2, inativando-o. A **ricina** (M_r 29.895), proteína extremamente tóxica da mamona, inativa a subunidade 60S dos ribossomos eucarióticos pela despurinação de uma adenosina específica no rRNA 28S. A ricina foi utilizada no infame caso do assassinato de um jornalista búlgaro da BBC, Georgi Markov, morto em 1978 supostamente pela polícia búlgara. Utilizando uma seringa escondida na ponta de um guarda-chuva, um membro da polícia secreta injetou um dispositivo contendo ricina na perna de Markov. Ele morreu 4 dias depois.

RESUMO 27.2 Síntese proteica

- A síntese proteica ocorre nos ribossomos, que consistem em proteínas e rRNA. As bactérias têm ribossomos 70S, com uma subunidade maior (50S) e uma menor (30S). Os ribossomos dos organismos eucarióticos são significativamente maiores (80S) e contêm mais proteínas.
- Os RNA transportadores contêm entre 73 e 93 resíduos de nucleotídeos, alguns dos quais têm bases modificadas. Cada tRNA tem o braço aminoacila com a sequência terminal CCA(3') – à qual um aminoácido é esterificado –, o braço do anticódon, o braço T ψ C e o braço D; alguns tRNA têm um quinto braço. O anticódon é responsável pela especificidade da interação entre o aminoacil-tRNA e o códon complementar do mRNA.
- O crescimento da cadeia polipeptídica nos ribossomos inicia com o aminoácido aminoterminal e ocorre por adições sucessivas de novos resíduos à extremidade carboxílica.
- A síntese proteica acontece em cinco etapas.

1. Os aminoácidos são ativados no citosol por aminoacil-tRNA-sintetases específicas. Essas enzimas catalisam a formação de aminoacil-tRNA, com a clivagem simultânea de ATP, gerando AMP e PP_i. A fidelidade da síntese proteica depende da precisão dessa reação, e algumas dessas enzimas realizam etapas de revisão em sítios ativados separados.

2. Nas bactérias, o aminoacil-tRNA iniciador de todas as proteínas é o *N*-formilmetionil-tRNA^{fMet}. A iniciação da síntese proteica envolve a formação de um complexo entre a subunidade 30S do ribossomo, o mRNA, o GTP, o fMet-tRNA^{fMet}, três fatores de iniciação e a subunidade 50S; o GTP é hidrolisado a GDP e P_i.

3. Nos estágios de alongamento, GTP e fatores de alongamento são necessários para a ligação do novo aminoacil-tRNA que chega ao sítio A do ribossomo. Na primeira reação de transferência peptídica, o resíduo fMet é transferido para o grupo amina do novo aminoacil-tRNA. O movimento do ribossomo ao longo do mRNA transloca, então, o dipeptidil-tRNA do sítio A para o sítio P, um processo que requer hidrólise de GTP. O tRNA desacilado se dissocia do sítio E do ribossomo.

4. Após muitos ciclos de alongamento, a síntese do polipeptídeo é finalizada com o auxílio dos fatores de

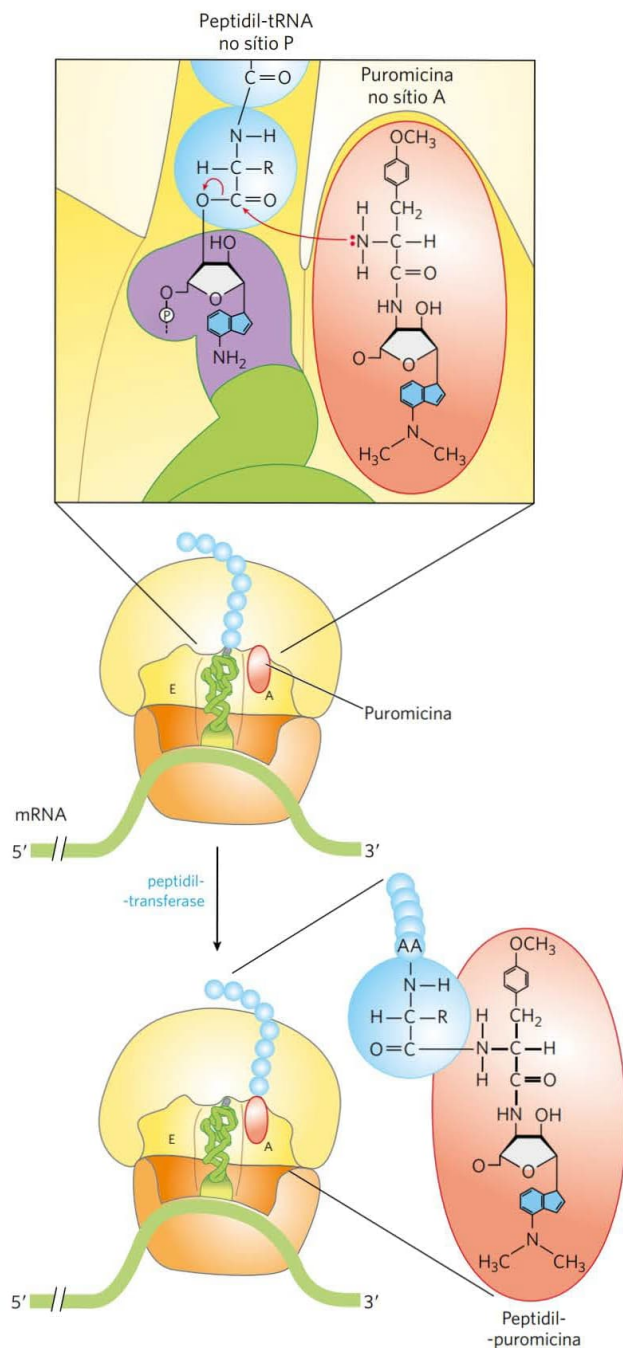


FIGURA 27-38 Perturbação da formação da ligação peptídica pela puomicina. O antibiótico puomicina é parecido com a extremidade aminoacila de um tRNA carregado, sendo capaz de se ligar ao sítio A do ribossomo e participar da formação da ligação peptídica. O produto dessa reação, peptidil-puomicina, não é translocado ao sítio P. Em vez disso, ele se dissocia do ribossomo, provocando, assim, uma terminação prematura da cadeia.

liberação. Pelo menos quatro equivalentes fosfatados de alta energia (do ATP ou do GTP) são necessários para a formação de cada ligação peptídica, investimento energético necessário para garantir a fidelidade da tradução.

5. Os polipeptídeos se enovelam nas suas respectivas formas tridimensionais ativas. Muitas proteínas são, ainda, processadas por reações de modificação pós-traducional.

- O perfil ribossômico permite que se possa determinar qual sequência gênica está sendo traduzida em um determinado momento.
- Muitos antibióticos e toxinas bem estudados inibem alguns aspectos da síntese proteica.

27.3 Endereçamento e degradação das proteínas

A célula eucariótica é composta por muitas estruturas, organelas e compartimentos, cada qual com funções específicas que necessitam de conjuntos distintos de proteínas e enzimas. Essas proteínas (com exceção das produzidas nas mitocôndrias e nos plastídeos) são sintetizadas nos ribossomos do citosol; então, como elas são direcionadas para os seus respectivos destinos finais na célula?

Atualmente, esse complexo e fascinante processo começa a ser compreendido. As proteínas destinadas à secreção, à integração na membrana plasmática ou à inclusão nos lisossomos geralmente compartilham as primeiras etapas de uma via que inicia no retículo endoplasmático (RE). As proteínas destinadas às mitocôndrias, aos cloroplastos ou ao núcleo utilizam três mecanismos separados. As proteínas destinadas ao citosol simplesmente permanecem no local onde são sintetizadas.

O elemento mais importante em muitas dessas vias de endereçamento é uma sequência curta de aminoácidos, denominada **sequência-sinal**, ou peptídeo sinalizador, cuja função foi postulada, pela primeira vez, por Günter Blobel e colaboradores, em 1970. A sequência-sinal direciona a proteína para o local apropriado na célula, e, em muitas proteínas, ela é removida durante o transporte ou depois que a proteína chegou ao seu destino final. Nas proteínas



Günter Blobel
[Fonte: cortesia de Günter Blobel, The Rockefeller University.]

que devem ser transportadas para mitocôndrias, cloroplastos ou RE, a sequência-sinal está localizada na porção aminoterminal do polipeptídeo recém-sintetizado. Em muitos casos, a capacidade de endereçamento de certas sequências-sinal foi confirmada por meio da fusão da sequência-sinal de uma proteína com outra proteína, mostrando que o sinal direciona a segunda proteína para o local onde a primeira proteína geralmente é encontrada. A degradação seletiva das proteínas que não são mais necessárias para a célula tam-

bém se baseia, em grande parte, em um conjunto de sinais moleculares incrustados na estrutura de cada proteína.

Nesta seção final, serão examinados o endereçamento e a degradação das proteínas, com ênfase nos sinais e na regulação molecular envolvidos, os quais são fundamentais para o metabolismo celular. Exceto quando citado, o foco agora será nas células eucarióticas.

As modificações pós-traducionais de muitas proteínas eucarióticas começam no retículo endoplasmático

Provavelmente, o sistema de endereçamento mais bem caracterizado tem início no RE. A maioria das proteínas lisossômicas, das proteínas de membrana e das proteínas secretadas têm uma sequência-sinal aminoterminal (**Figura 27-39**) que as marca para o transporte para dentro do lúmen do RE; centenas dessas sequências-sinal já foram determinadas. A extremidade carboxiterminal de uma sequência-sinal é definida por um sítio de clivagem, no qual uma protease atua removendo a sequência depois que a proteína tenha sido importada para o RE. As sequências-sinal têm um comprimento que varia entre 13 a 36 resíduos de aminoácidos, mas todas têm as seguintes características: (1) cerca de 10 a 15 resíduos de aminoácidos hidrofóbicos; (2) um ou mais resíduos carregados positivamente, geralmente próximos à extremidade

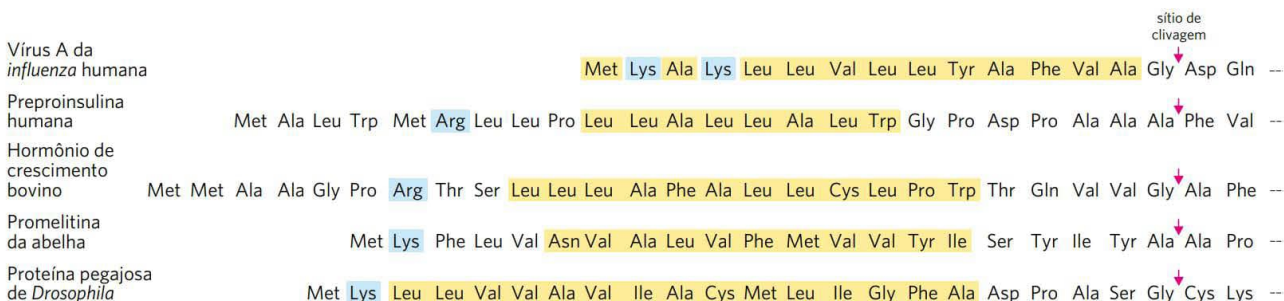


FIGURA 27-39 Sequências-sinal aminoterminais de algumas proteínas eucarióticas que direcionam o seu transporte para dentro do RE. O núcleo hidrofóbico (em amarelo) é precedido por um ou mais resíduos básicos (em azul). Os resíduos de aminoácidos com cadeias laterais curtas antecedem (à esquerda, como mostrado na Figura) os sítios de clivagem (indicados por setas vermelhas).

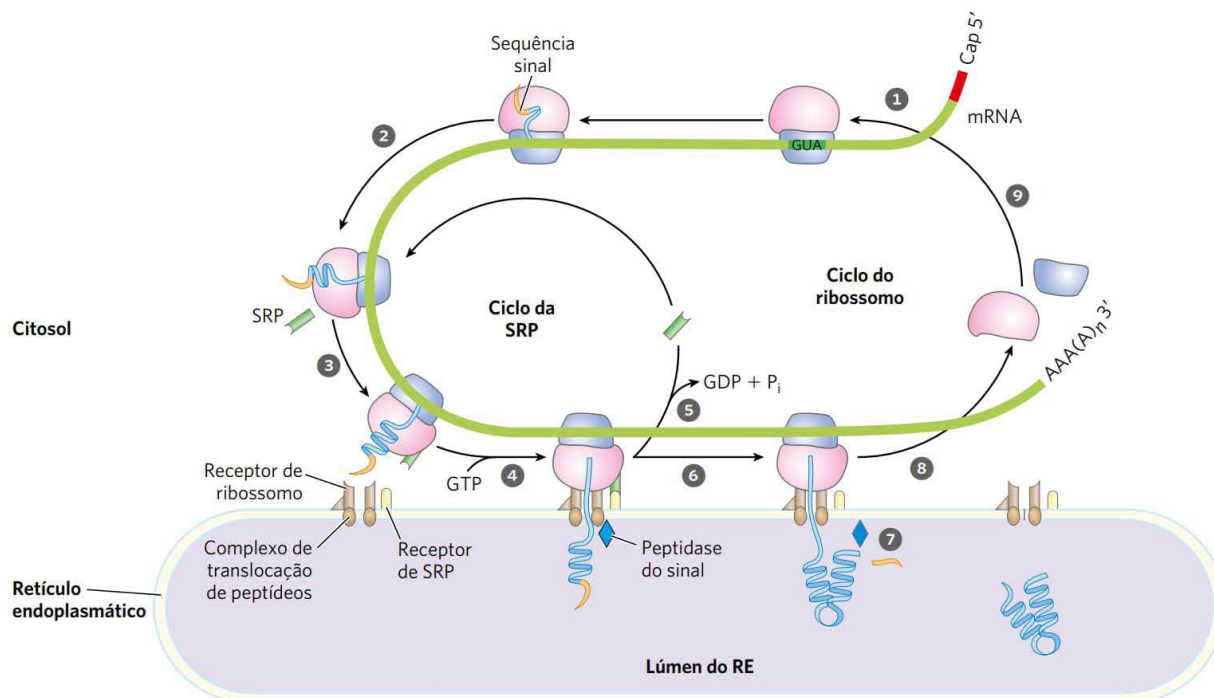


FIGURA 27-40 Endereçamento das proteínas eucarióticas com os sinais apropriados para o retículo endoplasmático. Esse processo envolve o ciclo da SRP, bem como o transporte e a clivagem do polipeptídeo nascente. As várias etapas estão descritas no texto. A SRP é um complexo formado por um RNA (7SL-RNA) de 300 nucleotídeos e seis proteínas diferentes (massa combinada de M_r 325.000). Uma das subunidades proteicas da SRP liga-se diretamente à sequência-sinal, inibindo o alongamento por meio do bloqueio espacial da entrada de aminoácil-tRNA e inibindo a peptidil-transferase. Outra subunidade da proteína se liga ao GTP, hidrolisando-o. O receptor da SRP é um heterodímero de subunidades α (M_r 69.000) e β (M_r 30.000), ambas as quais se ligam e hidrolisam várias moléculas de GTP durante o processo.

amino e que precede a sequência hidrofóbica; e (3) uma sequência curta na extremidade carboxilica (próxima do sítio de clivagem) que é relativamente polar, possuindo geralmente resíduos de aminoácidos com cadeias laterais curtas (principalmente Ala) nas posições mais próximas ao sítio de clivagem.

Como demonstrado originalmente por George Palade, as proteínas contendo essas sequências-sinal são sintetizadas em ribossomos aderidos ao RE. A sequência sinal ajuda a si mesma a se direcionar do ribossomo para o RE, como ilustrado na **Figura 27-40**. A via de endereçamento

começa com a iniciação da síntese proteica nos ribossomos livres (etapa 1). A sequência-sinal aparece logo no início do processo de síntese (etapa 2), pois está na extremidade amino-terminal, a qual, como foi visto, é sintetizada primeiro. À medida que essa sequência peptídica vai emergindo do ribossomo (etapa 3), a sequência-sinal e o próprio ribossomo se ligam à **partícula de reconhecimento de sinal (SRP, do inglês, *signal recognition particle*)**; a SRP,

então, liga-se ao GTP e suspende o alongamento do polipeptídeo quando este tiver alcançado um tamanho aproximado de 70 aminoácidos e a sequência-sinal tiver emergido completamente do ribossomo. Na etapa 4, a SRP com GTP ligado direciona o ribossomo (ainda ligado ao mRNA) e o peptídeo nascente ao receptor de SRP com GTP ligado no lado citosólico do RE; o peptídeo nascente é entregue ao **complexo de translocação de peptídeos** no RE, o qual interage diretamente com o ribossomo. Na etapa 5, ocorre a dissociação da SRP do ribossomo, acompanhada da hidrólise de GTP, tanto na SRP como no receptor de SRP. Agora, o alongamento do polipeptídeo é retomado (etapa 6), com o complexo de translocação direcionado por ATP levando o polipeptídeo nascente para dentro do lúmen do RE até que toda a proteína completa tenha sido sintetizada. Na etapa 7, a sequência-sinal é removida por uma peptidase-sinal presente no lúmen do RE. O ribossomo se dissocia (etapa 8) e é reciclado (etapa 9).

A glicosilação tem um papel-chave no endereçamento de proteínas

No lúmen do RE, as proteínas recém-sintetizadas sofrem mais modificações. Após a remoção das sequências-sinal, os polipeptídeos são enovelados, as ligações dissulfeto são formadas, e muitas proteínas são glicosiladas para formar



George Palade, 1912-2008
[Fonte: AP Photo.]

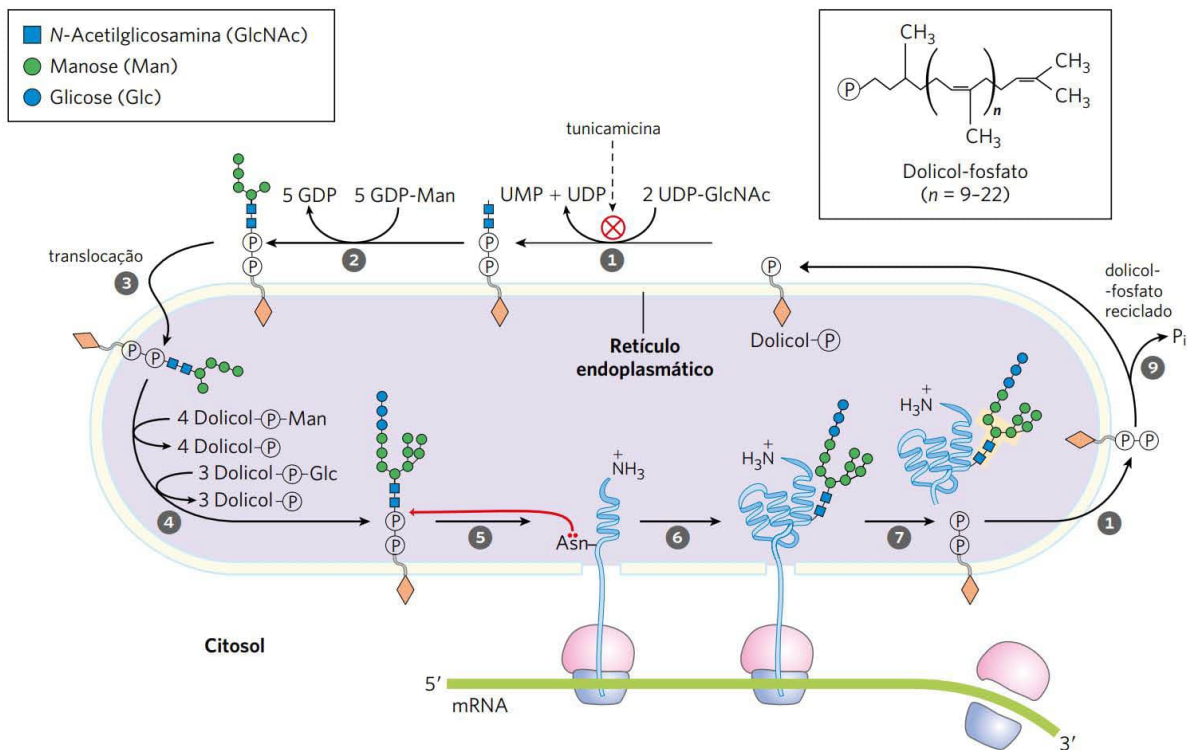
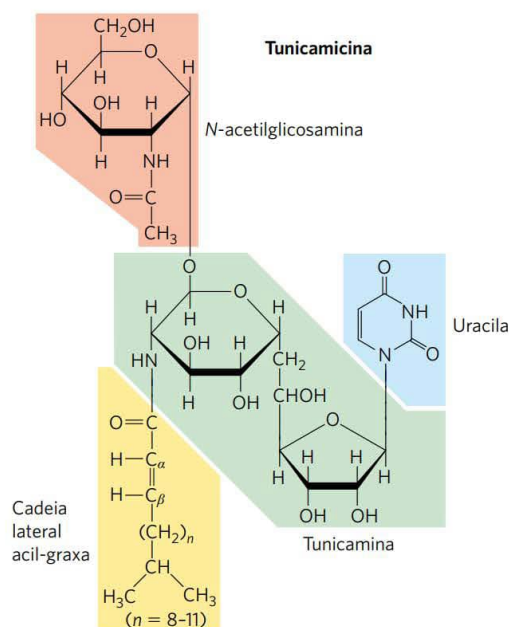


FIGURA 27-41 Síntese do oligossacarídeo central das glicoproteínas. O oligossacarídeo central é formado pela adição sucessiva de unidades de monossacarídeos. **1**, **2** As primeiras etapas ocorrem na face citosólica do RE. **3** A translocação move o oligossacarídeo ainda incompleto através da membrana (mecanismo não mostrado) e **4** a formação do oligossacarídeo completo ocorre dentro do lúmen do RE. Os precursores que fornecem mais resíduos de manose e de glicose ao oligossacarídeo em formação no lúmen são derivados do dolicol-fosfato. Na primeira etapa da síntese da porção de oligossacarídeo *N*-ligado de uma glicoproteína, **5**, **6** o oligossacarídeo central é transferido do dolicol-fosfato para um resíduo de Asn da proteína dentro do lúmen do RE. O oligossacarídeo central é novamente modificado no RE e no complexo de Golgi, por meio de vias que variam para diferentes proteínas. Os cinco resíduos de açúcar mostrados por uma marcação em bege (após a etapa **7**) são mantidos na estrutura final de todos os oligossacarídeos *N*-ligados. **8** O dolicol-pirofosfato liberado é novamente translocado, de forma que o pirofosfato fica no lado citosólico do RE, e, então, **9** um fosfato é removido hidroliticamente para regenerar o dolicol-fosfato.

glicoproteínas. Em muitas glicoproteínas, a ligação a seus oligossacarídeos ocorre através de resíduos de Asn. Esses oligossacarídeos *N*-ligados são variados (Capítulo 7), mas as vias pelas quais eles são formados têm a primeira etapa em comum. Um oligossacarídeo central de 14 resíduos é formado passo a passo e depois transferido de uma molécula de dolicol-fosfato doadora para determinados resíduos de Asn na proteína (**Figura 27-41**). A transferase fica na face luminal do RE e, portanto, não é capaz de catalisar a glicosilação de proteínas citosólicas. Após a transferência, o oligossacarídeo central sofre clivagens e ajustes, que variam nas diferentes proteínas, mas todos os oligossacarídeos *N*-ligados mantêm como cerne um pentassacarídeo derivado do oligossacarídeo original de 14 resíduos. Vários antibióticos agem interferindo em uma ou mais etapas desse processo e têm ajudado a elucidar os passos da glicosilação de proteínas. O mais bem caracterizado é a **tunicamicina**, que imita a estrutura da UDP-*N*-acetilglicosamina e bloqueia a primeira etapa do processo (Figura 27-41, etapa ➊). Algumas proteínas são *O*-glicosiladas no RE, mas a maioria das *O*-glicosilações ocorre no complexo de Golgi ou no citosol (no caso das proteínas que não entram no RE).



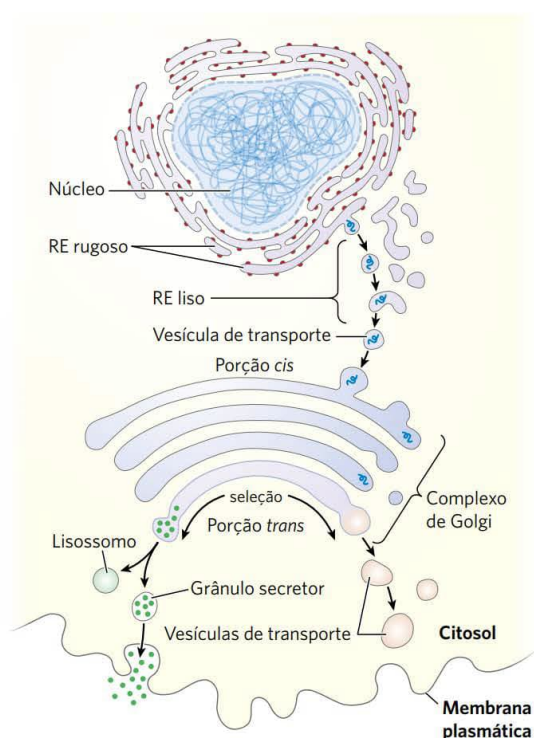


FIGURA 27-42 Via adotada pelas proteínas com destino aos lisossomos, à membrana plasmática ou à secreção. As proteínas são transportadas do RE para a porção *cis* do complexo de Golgi dentro de vesículas de transporte. A seleção ocorre principalmente no lado *trans* do complexo de Golgi.

As proteínas adequadamente modificadas podem, então, ser transportadas para vários destinos na célula. As proteínas vão do RE para o complexo de Golgi dentro de vesículas de transporte (**Figura 27-42**). No complexo de Golgi, os oligossacarídeos são *O*-ligados a algumas proteínas, e os oligossacarídeos *N*-ligados são modificados. Usando mecanismos ainda pouco conhecidos, o complexo de Golgi também seleciona proteínas, enviando-as para seus destinos finais. Os processos precisam distinguir e separar as proteínas secretadas das que são direcionadas para a membrana plasmática ou para os lisossomos com base em características estruturais que não sejam as sequências-sinal, pois estas foram removidas no lúmen do RE.

Esse processo de seleção é mais bem compreendido no caso das hidrolases, cujo destino é serem transportadas aos lisossomos. Quando chega uma hidrolase (que é uma glicoproteína) no complexo de Golgi, uma característica que ainda não se conhece (às vezes chamada de fragmento-sinal) da estrutura tridimensional da hidrolase é reconhecida por uma fosfotransferase, a qual fosforila certos resíduos de manose do oligossacarídeo (**Figura 27-43**). A presença de um

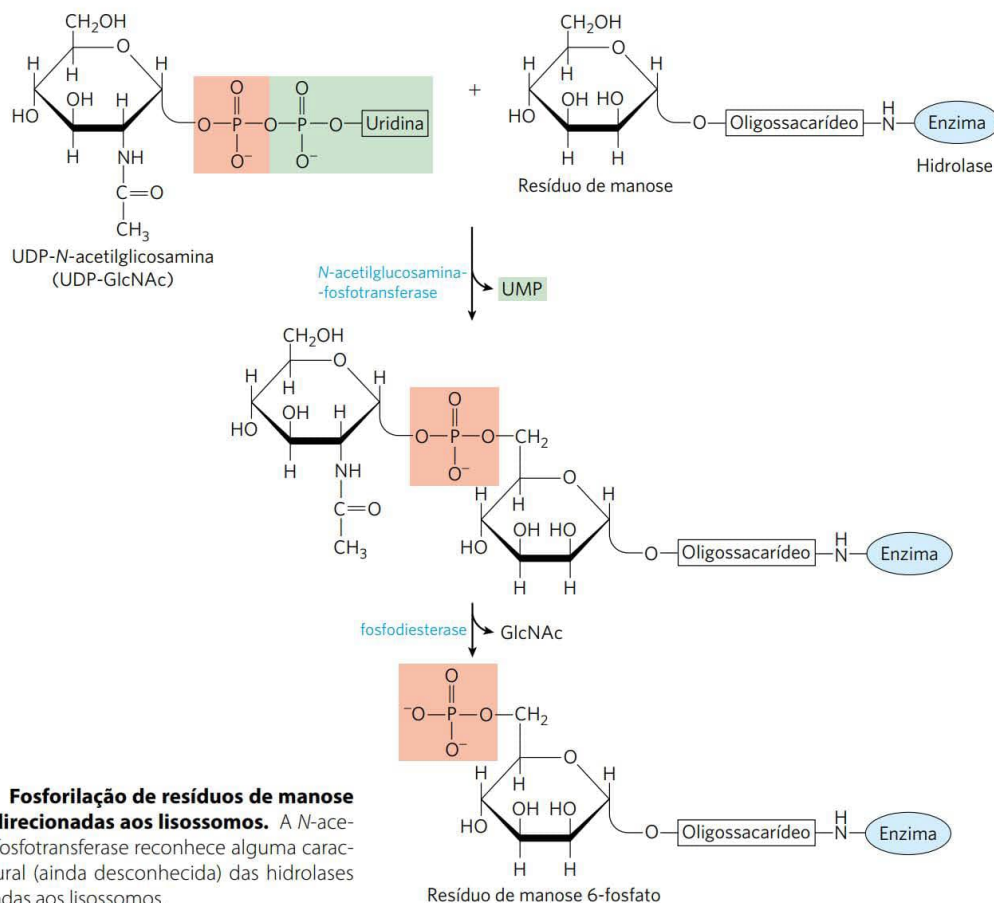


FIGURA 27-43 Fosforilação de resíduos de manose nas enzimas direcionadas aos lisossomos. A *N*-acetilglicosamina-fosfotransferase reconhece alguma característica estrutural (ainda desconhecida) das hidrolases que são destinadas aos lisossomos.

ou mais resíduos de manose-6-fosfato no oligossacarídeo *N*-ligado é o sinal estrutural que direciona uma proteína para os lisossomos. Uma proteína receptora na membrana do complexo de Golgi reconhece o sinal de manose-6-fosfato e liga-se à hidrolase assim marcada. As vesículas contendo esses complexos de receptor-hidrolase brotam da porção *trans* do complexo de Golgi e vão até vesículas de seleção. Nessas vesículas de seleção, o complexo receptor-hidrolase se dissocia por meio de um processo que é facilitado pelo pH mais baixo da vesícula e pela remoção, catalisada por uma fosfatase, dos grupos fosfato dos resíduos de manose-6-fosfato. O receptor é, então, reciclado para o complexo de Golgi, e as vesículas contendo as hidrolases brotam das vesículas de seleção e se dirigem aos lisossomos. Em células tratadas com tunicamicina (Figura 27-41, etapa 1), as hidrolases que deveriam ser direcionadas aos lisossomos são secretadas, confirmando que o oligossacarídeo *N*-ligado exerce um papel-chave no endereçamento dessas enzimas para os lisossomos.

As vias que direcionam as proteínas para mitocôndrias e cloroplastos também se baseiam em sequências-sinal aminoterminal. Apesar de mitocôndrias e cloroplastos conterem DNA, a maioria das suas proteínas é codificada pelo DNA nuclear e deve ser direcionada às organelas corretas. No entanto, diferentemente de outras vias de endereçamento, as vias para mitocôndrias e cloroplastos iniciam somente *depois* que a proteína precursora foi completamente sintetizada e liberada dos ribossomos. As proteínas precursoras destinadas a mitocôndrias ou cloroplastos são ligadas por proteínas citosólicas da família das chaperonas e levadas até receptores presentes na superfície externa da organela de destino. Mecanismos de translocação especializados transportam, então, a proteína até o seu destino final na organela e, após essa etapa, a sequência-sinal é removida.

As sequências-sinal para o transporte nuclear não são clivadas

A comunicação molecular entre o núcleo e o citosol necessita do movimento de macromoléculas através de poros na membrana nuclear. As moléculas de RNA sintetizadas no núcleo são exportadas para o citosol. As proteínas ribossômicas sintetizadas em ribossomos citosólicos são importadas para o núcleo e montadas para formar as subunidades 60S e 40S dos ribossomos no nucléolo, então as subunidades completas são exportadas de volta para o citosol. Diversas proteínas nucleares (RNA e DNA-polimerases, histonas, topoisomerases, proteínas que regulam a expressão gênica, e assim por diante) são sintetizadas no citosol e importadas para o núcleo. Esse tráfego é modulado por um complexo sistema que envolve sinais moleculares e proteínas de transporte e que vem sendo elucidado aos poucos.

Na maioria dos eucariotos multicelulares, o envelope nuclear é rompido a cada divisão celular; quando a divisão termina e o envelope é restabelecido, as proteínas nucleares que haviam se dispersado precisam ser novamente importadas para o núcleo. Para possibilitar que essa importação seja repetida várias vezes, a sequência-sinal que direciona

uma proteína para o núcleo – a **sequência de localização nuclear (NLS, do inglês, nuclear localization sequence)** – não é removida depois que a proteína atinge seu destino. Uma NLS, ao contrário de outras sequências-sinal, pode estar localizada praticamente em qualquer região da sequência primária da proteína. As NLS podem variar consideravelmente, mas muitas são formadas por uma sequência de 4 a 8 resíduos de aminoácidos que incluem vários resíduos básicos (Arg ou Lys) consecutivos.

A importação pelo núcleo é mediada por várias proteínas que fazem um ciclo entre o citosol e o núcleo (**Figura 27-44**), incluindo α e β -importina e uma GTPase pequena, denominada Ran (do inglês *Ras-related nuclear protein* [proteína nuclear relacionada à Ras]). Um heterodímero de α e β -importinas age como um receptor solúvel das proteínas direcionadas para o núcleo, sendo que a subunidade α se liga a proteínas contendo NLS no citosol. O complexo da importina com a proteína que tem NLS associa-se a um poro nuclear e é transportado através do poro por um mecanismo dependente de energia. No núcleo, a β -importina liga-se à Ran GTPase, liberando a β -importina da proteína importada. A β -importina está ligada à Ran e à CAS (proteína celular de suscetibilidade à apoptose) e é separada da proteína que tem NLS. As α e β -importinas, quando formando complexos com Ran e CAS, são, então, exportadas para fora do núcleo. A Ran hidrolisa GTP no citosol para liberar as importinas, as quais ficam então livres para iniciar um novo ciclo de importação. A própria Ran é reciclada de volta para o núcleo pela ligação da Ran-GDP ao fator 2 de transporte nuclear (NTF2). Dentro do núcleo, o GDP ligado à Ran é substituído por GTP pela ação do fator de troca Ran-nucleotídeo de guanosina (RanGEF; ver Quadro 12-1).

Durante a mitose, quando o envelope nuclear é temporariamente rompido, a Ran-GTPase e as importinas desempenham outros papéis. O complexo Ran GTPase- β -importina ajuda a posicionar o fuso de microtúbulos no perímetro da célula para facilitar a segregação dos cromossomos na divisão celular, e esse complexo também regula a interação dos microtúbulos com outras estruturas celulares.

As bactérias também usam sequências-sinal para o endereçamento de proteínas

As bactérias são capazes de direcionar proteínas para a membrana interna ou externa, para o espaço periplasmático (espaço entre essas membranas) e para o meio extracelular. Elas usam sequências-sinal presentes na extremidade aminoterminal das proteínas (**Figura 27-45**), de maneira semelhante àquelas proteínas eucarióticas que são direcionadas ao RE, às mitocôndrias e aos cloroplastos.

A maioria das proteínas exportadas de *E. coli* fazem uso da via mostrada na **Figura 27-46**. Após a tradução, uma proteína a ser exportada se enovela de forma mais lenta, pois a sequência-sinal aminoterminal impede o seu enovelamento. A proteína chaperona solúvel SecB se liga à sequência-sinal da proteína ou a outras partes da sua estrutura na proteína ainda parcialmente enovelada. A proteína ligada é, então, levada à SecA, proteína associada à superfície interna da membrana plasmática. A SecA atua tanto como recep-

Proteínas da membrana interna

Fago fd, proteína maior do envelope Met **Lys Lys** Ser Leu Val Leu **Lys** Ala Ser Val Ala Val Ala Thr Leu Val Pro Met Leu Ser Phe Ala Ala Glu --

Fago fd, proteína menor do envelope Met **Lys Lys** Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ser His Ser Ala Glu --

Proteínas periplasmáticas

Fosfatase alcalina Met **Lys** Gln Ser Thr **Ile** Ala Leu Ala Leu Leu Pro Leu Leu Phe Thr Pro Val Thr Lys Ala Arg Thr --

Proteína de ligação específica de leucina Met **Lys** Ala Asn Ala **Lys** Thr Ile **Ile** Ala Gly Met Ile Ala Leu Ala Ile Ser His Thr Ala Met Ala Asp Asp --

β -Lactamase de pBR322 Met Ser Ile Gln **His** Phe **Arg** Val Ala Leu Ile Pro Phe Phe Ala Ala Phe Cys Leu Pro Val Phe Ala His Pro --

Proteínas da membrana externa

Lipoproteína Met **Lys** Ala Thr **Lys** Leu Val Leu Gly Ala Val Ile Leu Gly Ser Thr Leu Leu Ala Gly Cys Ser --

LamB Leu **Arg Lys** Leu Pro Leu Ala Val Ala Val Ala Ala Gly Val Met Ser Ala Gln Ala Met Ala Val Asp --

OmpA Met Met Ile Thr Met **Lys Lys** Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Ala Pro --

FIGURA 27-45 Sequências-sinal que direcionam as proteínas para diferentes locais nas bactérias. Os aminoácidos básicos próximos à extremidade aminoterminal estão marcados em azul, e os núcleos de aminoácidos hidrofóbicos, em amarelo. Os sítios de clivagem que marcam o final das sequências-sinal estão indicados por setas vermelhas. Observe que é na membrana celular interna das bactérias (ver Figura 1-7) que o DNA e as proteínas de envelope de fagos fd são montadas para formar as partículas virais. OmpA é a proteína A da membrana externa; LamB é uma proteína da superfície celular receptora do fago λ .

nominadas **depressões revestidas**, nas quais existe uma concentração preferencial de receptores endocíticos em relação a outras proteínas de superfície celular. As depressões são revestidas, no lado citosólico, por uma rede formada pela proteína **clatrina**, a qual forma estruturas poliédricas fechadas (**Figura 27-48**). A rede de clatrina aumenta à medida que mais receptores vão sendo ocupados pelas proteínas-alvo. Por fim, uma vesícula endocítica completa ainda ligada à membrana se solta da membrana plasmática com ajuda da **dinamina**, uma GTPase grande, e entra no citoplasma. A clatrina é rapidamente removida por enzimas removedoras do revestimento, e a vesícula se funde a um endossomo. A atividade ATPásica nas membranas reduz o pH interno do endossomo, facilitando a dissociação dos receptores de suas proteínas-alvo. Em uma via relacionada,

a caveolina causa a invaginação de segmentos da membrana contendo rafetes lipídicos associados a certos tipos de receptores (ver Figura 11-20). Essas vesículas endocíticas então se fundem com estruturas internas contendo caveolina, chamadas de caveossomos, nos quais as moléculas internalizadas são selecionadas e redirecionadas para outras partes da célula, e as caveolinas são preparadas para serem recicladas para a superfície da membrana. Também existem vias independentes de clatrina e de caveolina; algumas fazem uso da dinamina, outras não.

As proteínas e os receptores importados seguem, então, caminhos separados e seus destinos variam conforme o tipo de célula e de proteína. A transferrina e seu receptor são eventualmente reciclados. Alguns hormônios, fatores de crescimento e complexos do sistema imune, após induzirem

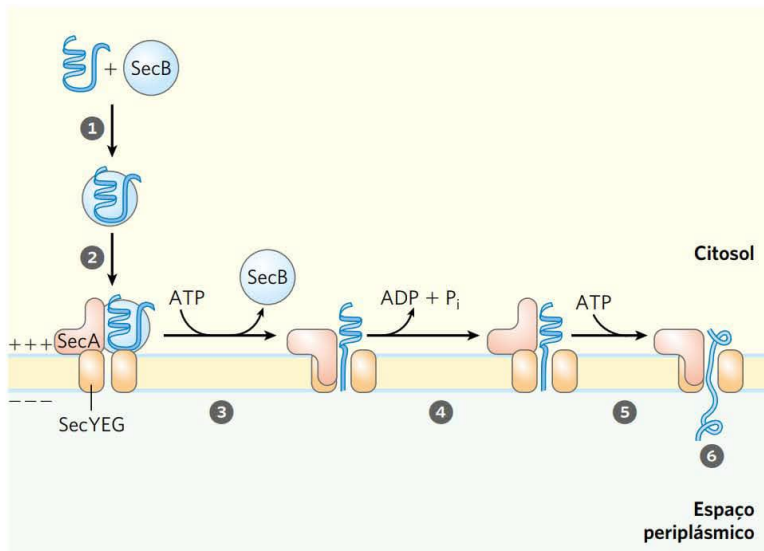


FIGURA 27-46 Modelo para a exportação de proteínas em bactérias. 1 Um polipeptídeo recém-traduzido se liga à proteína chaperona citosólica SecB, a qual 2 o leva até a SecA, uma proteína associada ao complexo de transporte (SecYEG) na membrana celular da bactéria. 3 A SecB é liberada, e a SecA se insere na membrana, forçando a passagem de um segmento de cerca de 20 resíduos de aminoácidos da proteína a ser exportada por meio do complexo de transporte. 4 A hidrólise de um ATP pela SecA fornece a energia para que ocorra uma mudança conformacional, a qual faz a SecA se soltar da membrana, liberando o polipeptídeo. 5 A SecA liga outro ATP, e o próximo segmento de 20 resíduos de aminoácidos é empurrado através do complexo de transporte presente na membrana. As etapas 4 e 5 são repetidas até que 6 toda a proteína tenha passado através da membrana, sendo liberada no periplasma. O potencial eletroquímico dentro da membrana (definido como + e -) também fornece parte da energia necessária para o transporte das proteínas.

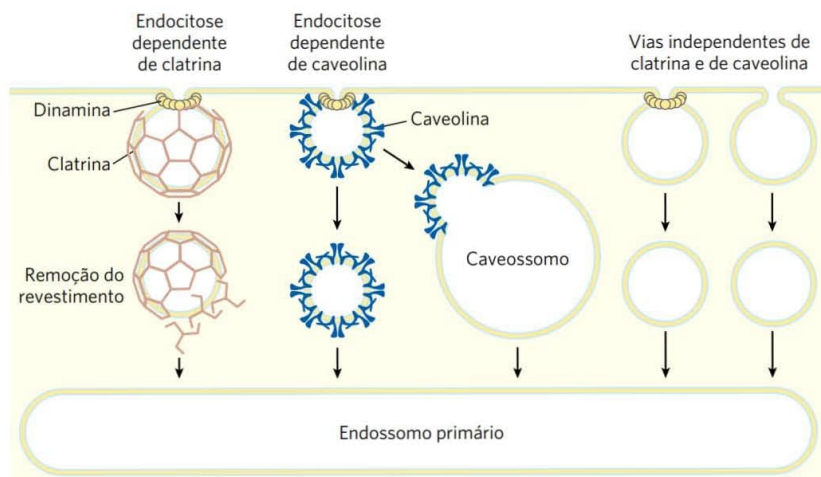


FIGURA 27-47 Resumo das vias endocíticas em células eucarióticas. As vias dependentes de clatrina e de caveolina fazem uso da GTPase dinamina para desprender vesículas da membrana plasmática. Algumas vias não utilizam clatrina nem caveolina; algumas delas fazem uso da dinamina, enquanto outras, não. [Fonte: informação de S. Mayor e R. E. Pagano, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8:603, 2007.]

a resposta celular apropriada, são degradados juntamente com os seus receptores. A LDL é degradada depois que o colesterol associado a ela tenha sido levado até seu destino, mas o receptor de LDL é reciclado (ver Figura 21-41).

A endocitose mediada por receptor é utilizada por algumas toxinas e por alguns vírus para entrarem em células.

O vírus da *influenza*, a toxina diftérica e a toxina da cólera entram na célula dessa maneira.

A degradação de proteínas é mediada por sistemas especializados em todas as células

A degradação de proteínas é fundamental para a proteólise geral das células, evitando a produção de proteínas anormais ou indesejadas e permitindo a reciclagem dos aminoácidos. A meia-vida das proteínas eucarióticas varia de 30 segundos até muitos dias. Muitas proteínas apresentam uma taxa de renovação rápida, se for considerado o tempo de vida de uma célula, embora poucas (como a hemoglobina) possam durar por toda a vida da célula (cerca de 110 dias, no caso de um eritrócito). As proteínas degradadas rapidamente incluem aquelas que são defeituosas devido à inserção de aminoácidos errados ou em virtude de danos acumulados durante o funcionamento normal. E as enzimas que atuam em pontos-chave da regulação de vias metabólicas geralmente apresentam uma renovação rápida.

As proteínas defeituosas e aquelas com meia-vida caracteristicamente curta geralmente são degradadas tanto nas células bacterianas como nas células eucarióticas por sistemas citosólicos seletivos dependentes de ATP. Um segundo sistema, que opera nos lisossomos das células de vertebrados, recicla os aminoácidos das proteínas de membrana, das proteínas extracelulares e das proteínas de meia-vida caracteristicamente longa.

Em *E. coli*, muitas proteínas são degradadas por um dos vários sistemas proteolíticos que possuem AAA+-ATPases (ver capítulo 25), inclusive Lon (o nome se refere à “forma longa” das proteínas, observado apenas quando essa protease está ausente), ClpXP, ClpAP, ClpCP, ClpYQ e FtsH. Cada sistema tem como alvo determinadas proteínas, as quais são reconhecidas pela sua estrutura, localização subcelular ou ambas. Em geral, a hidrólise de ATP é utilizada para manipular a proteína-alvo através de um poro para dentro da câmara proteolítica, e a proteína é desnaturada no decorrer desse processo. As proteínas são clivadas dentro da câmara. Uma vez que a proteína tenha sido reduzida a peptídeos pequenos e inativos, outro processo, este independente de ATP, completa a degradação.

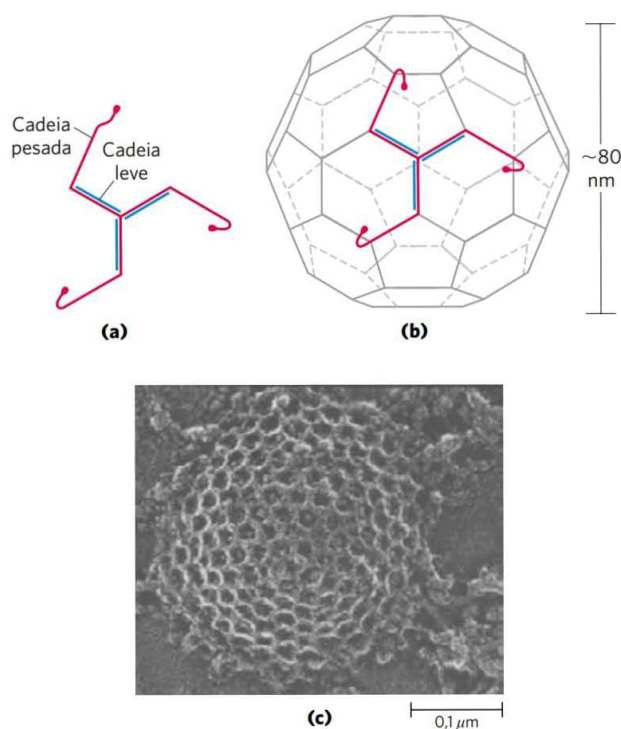


FIGURA 27-48 Clatrina. (a) As três cadeias leves (L) (M_r 35.000) e três cadeias pesadas (H) (M_r 180.000) da unidade de clatrina (HL)₃, organizadas em uma estrutura de três pernas, chamada de tríscele. (b) Os trísceles tendem a se agrupar, formando redes polidédricas. (c) Micrografia eletrônica de uma depressão revestida presente na face citosólica da membrana plasmática de um fibroblasto. [Fonte: (c) ©1980 Heuser. The Rockefeller University Press. J. Heuser, *J. Cell Biol.* 84:560, 1980. doi:10.1083/jcb.84.3.560.]

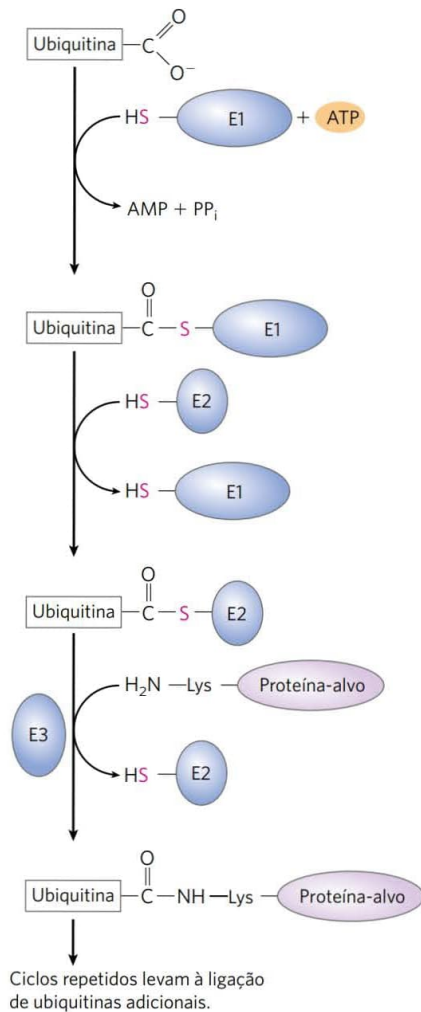


FIGURA 27-49 Via de três etapas da ligação de ubiquitina a proteínas. A via inclui dois intermediários enzima-ubiquitina diferentes. Primeiro, o grupo carboxílico livre do resíduo de Gly da extremidade carboxiterminal é ligado, por meio de um tioéster, a uma enzima ativadora da classe E1. A ubiquitina é, então, transferida para a enzima conjugadora E2. Por fim, a ligase E3 catalisa a transferência da ubiquitina da E2 para a proteína-alvo, ligando a ubiquitina por meio de uma amida (iso-peptídeo) com um grupo ε-amino de um resíduo de Lys da proteína-alvo. Ciclos adicionais produzem poliubiquitina, um polímero covalente composto por subunidades de ubiquitina que direcionam a proteína ligada para que ela seja destruída em eucariotos. Várias vias desse tipo, com diferentes proteínas-alvo, estão presentes na maioria das células eucarióticas.

A via dependente de ATP em células eucarióticas é um tanto diferente, envolvendo a proteína **ubiquitina**, a qual, como o nome sugere, está presente em todos os reinos eucarióticos. Uma das proteínas conhecidas mais conservadas, a ubiquitina (76 resíduos de aminoácidos) é praticamente idêntica em organismos tão diferentes como a levedura e o ser humano e é fundamental tanto para a proteostase (ver Figuras 4-25 e 15-2) como para a regulação do ciclo celular (ver Figura 12-53). A ubiquitina é ligada covalentemente a proteínas cujo destino é a destruição por meio da via dependente de ATP, que inclui três enzimas diferentes: a enzima ativadora E1, a enzima conjugadora E2 e a ligase E3 (**Figura 27-49**).

As proteínas ubiquitinadas são degradadas por um grande complexo, conhecido como **proteassomo 26S** ($M_r 2,5 \times 10^6$) (**Figura 27-50**). O proteassomo das células eucarióticas é formado por duas cópias, cada uma de, no mínimo, 32 subunidades diferentes, sendo a maioria delas altamente conservada, desde leveduras até os seres humanos. O proteassomo contém dois tipos principais de subcomplexos, uma partícula central em forma de barril e partículas regulatórias em cada extremidade do barril. A partícula central 20S é formada por quatro anéis: o anel mais externo é formado por sete subunidades α e o anel interno por sete subunidades β . Três das sete subunidades em cada anel β apresentam atividade proteolítica, cada uma com uma especificidade diferente para o substrato. Os anéis empilhados da partícula central formam a estrutura semelhante a um barril, dentro da qual as proteínas-alvo são degradadas. A partícula reguladora 19S de cada extremidade da partícula central contém aproximadamente 18 subunidades, incluindo algumas que reconhecem e se ligam a proteínas ubiquitinadas. Seis dessas subunidades são AAA+-ATPases que possivelmente funcionam desenovelando as proteínas ubiquitinadas e translocando os polipeptídeos desenovelados para a partícula central onde eles são degradados. A partícula 19S também desubiquitina as proteínas à medida que elas vão sendo degradadas no proteassomo. A maioria das células têm, ainda, outros complexos de regulação que podem substituir a partícula 19S. Esses reguladores alternativos não hidrolisam ATP e não ligam ubiquitina, mas

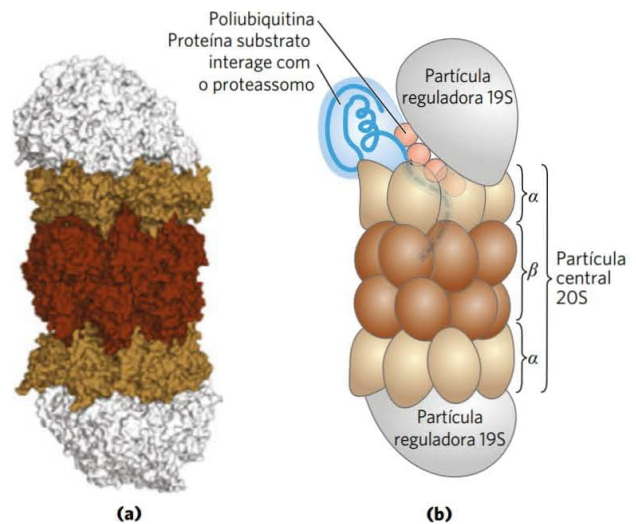


FIGURA 27-50 Estrutura tridimensional do proteassomo eucariótico. O proteassomo 26S é altamente conservado em todos os eucariotos. As duas estruturas são a partícula central de 20S e a partícula reguladora de 19S, ou cap. (a) A partícula central é formada por quatro anéis organizados na forma de uma estrutura tipo barril. Cada um dos anéis internos tem sete subunidades β diferentes (em marrom-escuro), três das quais têm atividade proteolítica. Cada um dos anéis externos possui sete subunidades α diferentes (em marrom-claro). Uma partícula reguladora forma um cap em cada uma das extremidades da partícula central (em cinza). (b) A partícula reguladora liga-se a proteínas ubiquitinadas, desdobra-as e as transloca para dentro da partícula central, onde elas são degradadas a peptídeos de 3 a 25 aminoácidos. [Fonte: (a) PDB ID 3L5Q, K. Sadrebaaz et al., *Mol. Cell* 37:728, 2010.]

são importantes para a degradação de proteínas celulares específicas. O proteassomo 26S pode ser efetivamente “assessorado” por complexos de regulação que mudam conforme as alterações nas condições na célula.

Nem todos os sinais que desencadeiam a ubiquitinação estão bem compreendidos ainda. Apesar disso, um sinal simples foi encontrado. Para muitas proteínas, a natureza do primeiro resíduo de aminoácido que permanece após a remoção do resíduo Met aminoterminal, e de qualquer outro processamento proteolítico pós-traducional da extremidade aminoterminal, tem grande influência na meia-vida da proteína (Tabela 27-9). Esses sinais aminoterminais permaneceram conservados ao longo dos bilhões de anos de evolução e são os mesmos tanto nos sistemas de degradação de proteínas em bactérias quanto na via de ubiquitinação dos seres humanos. Sinais mais complexos, como a sequência para a destruição, discutida no Capítulo 12 (ver Figura 12-35), também vêm sendo identificados.

A proteólise dependente de ubiquitina é importante tanto para a regulação de processos celulares como para a eliminação de proteínas defeituosas. Muitas proteínas necessárias em apenas um estágio do ciclo de uma célula eucariótica são rapidamente degradadas pela via dependente de ubiquitina após completarem as suas funções. A destruição da ciclina por um sistema dependente de ubiquitina é fundamental para a regulação do ciclo celular. Os componentes E1, E2 e E3 da via de ubiquitinação (Figura 27-49) são, na verdade, grandes famílias de proteínas. Enzimas E1, E2 e E3 diferentes apresentam especificidades diferentes para proteínas-alvo e, portanto, regulam processos celulares diferentes. As concentrações de algumas dessas enzimas são maiores em determinados compartimentos celulares e isso reflete suas funções especializadas.



Não é de surpreender que defeitos na via de ubiquitinação estejam envolvidos em uma ampla gama de estados patológicos. A incapacidade de degradar algumas

proteínas que ativam a divisão celular (produtos dos oncogenes) pode levar à formação de tumores, ao passo que o mesmo efeito pode ser causado por uma degradação muito rápida de proteínas que atuam como supressores tumorais. A degradação não eficiente ou muito rápida de proteínas celulares também parece ter um papel em um grande número de outras condições: doenças renais, asma, doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson (associadas à formação de estruturas proteínicas características nos neurônios), fibrose cística (causada, em alguns casos, por uma degradação muito rápida de um canal de cloro, resultando na perda da função; ver Quadro 11-2), síndrome de Liddle (na qual um canal de sódio no rim não é degradado, levando à absorção de Na^+ em excesso e a um início precoce de hipertensão) – e muitas outras doenças. Fármacos desenvolvidos para inibir a função proteossômica estão sendo utilizados como tratamentos potenciais para algumas dessas condições. Em um ambiente metabólico que sofre constantes mudanças, a degradação de proteínas é tão importante para a sobrevivência de uma célula quanto à síntese proteica e muito ainda está por ser descoberto a respeito dessas vias. ■

RESUMO 27.3 Endereçamento e degradação de proteínas

- Após serem sintetizadas, muitas proteínas são direcionadas para locais específicos da célula. Um dos mecanismos de endereçamento envolve uma sequência-sinal peptídica, geralmente encontrada na extremidade aminoterminal da proteína recém-sintetizada.
- Nas células eucarióticas, um grupo de sequências-sinal é reconhecido pela partícula de reconhecimento de sinal (SRP), a qual se liga à sequência-sinal logo que esta aparece no ribossomo e transfere todo o ribossomo e o polipeptídeo incompleto para o RE. Os polipeptídeos contendo essas sequências-sinal são transportados para dentro do lúmen do RE à medida que vão sendo sintetizados e, então, no lúmen, eles podem ser modificados e transportados para o complexo de Golgi, para depois serem selecionados e enviados para os lisossomos, para a membrana plasmática ou para as vesículas de transporte.
- As proteínas direcionadas para mitocôndrias e cloroplastos nas células eucarióticas e aquelas destinadas para exportação nas bactérias também fazem uso de uma sequência-sinal aminoterminal.
- As proteínas direcionadas para o núcleo têm uma sequência-sinal interna que, diferentemente de outras sequências-sinal, não é clivada após o endereçamento adequado da proteína.
- Algumas células eucarióticas importam proteínas por meio de endocitose mediada por receptor.
- No final, todas as células degradam proteínas utilizando sistemas proteolíticos especializados. As proteínas defeituosas e aquelas destinadas a uma rápida renovação são geralmente degradadas por um sistema dependente de ATP. Nas células eucarióticas, as proteínas são, primeiramente, marcadas pela ligação à ubiquitina, uma proteína altamente conservada. A proteólise dependente de ubiquitina é realizada pelos proteassomos – também altamente conservados – e é fundamental para a regulação de muitos processos celulares.

TABELA 27-9 Relações entre a meia-vida de uma proteína e o resíduo de aminoácido da extremidade aminoterminal

Resíduo aminoterminal	Meia-vida ^a
Estabilizadores	
Ala, Gly, Met, Ser, Thr, Val	> 20 h
Desestabilizadores	
Gln, Ile	~ 30 min
Glu, Tyr	~ 10 min
Pro	~ 7 min
Asp, Leu, Lys, Phe	~ 3 min
Arg	~ 2 min

Fonte: informações de A. Bachmair et al., *Science* 234:179, 1986.

^aAs meias-vidas foram medidas em leveduras para a proteína β -galactosidase, que foi modificada de forma a possuir um resíduo aminoterminal diferente em cada experimento. As meias-vidas variam para diferentes proteínas e em diferentes organismos, mas esse padrão geral parece se manter em todos os organismos.

Termos-chave

Termos em negrito estão definidos no glossário.

aminoacil-tRNA 1078	terminação 1107
aminoacil-tRNA-sintetases 1078	fatores de liberação 1107
tradução 1078	supressor sem sentido 1107
códon 1079	polissomo 1109
fase de leitura 1079	modificação pós-traducional 1110
códon de iniciação 1081	perfil ribossômico 1111
códons de terminação 1081	puromicina 1112
fase de leitura aberta 1081	tetraciclina 1112
anticódon 1084	cloranfenicol 1112
oscilação 1084	cicloeximida 1112
mudança de fase de tradução 1085	estreptomicina 1112
edição de RNA 1086	toxina diftérica 1113
iniciação 1101	ricina 1113
sequência de Shine-Dalgarno 1101	sequência-sinal 1114
sítio aminoacila (A) 1101	partícula de reconhecimento de sinal (SRP) 1115
sítio peptidil (P) 1101	complexo de translocação de peptídeos 1115
sítio de saída (E) 1101	tunicamicina 1116
complexo de iniciação 1102	sequência de localização nuclear (NLS) 1118
alongamento 1103	depressões revestidas 1120
fatores de alongamento 1104	clatrina 1120
peptidil-transferase 1105	dinamina 1120
translocação 1105	ubiquitina 1122
	proteassomo 1122

Teste seu conhecimento

1. Tradução do RNA mensageiro Quais seriam as sequências de aminoácidos dos peptídeos formados pelos ribossomos em resposta às seguintes sequências de mRNA, considerando-se que a fase de leitura inicia com as três primeiras bases em cada sequência?

- GGUCAGUCGCUCCUGAUU
- UUGGAUGCGCCAAUAAUUGCU
- CAUGAUGCCUGUUGCUAC
- AUGGACGAA

2. Quantas sequências diferentes de mRNA podem especificar uma sequência de aminoácido? Escreva todas as sequências possíveis de mRNA que podem codificar para o segmento tripeptídico Leu-Met-Tyr. A resposta dará uma ideia sobre o número de possíveis mRNA capazes de codificar um polipeptídeo.

3. A sequência de bases de um mRNA pode ser predita a partir da sequência de aminoácidos do polipeptídeo produzido a partir desse mRNA? Se o quadro de leitura for especificado, uma dada sequência de bases de um mRNA codificará uma – e apenas uma – sequência de aminoácidos em um polipeptídeo. A partir de uma dada sequência de resíduos de aminoácidos em uma proteína, como, por exemplo, o citocromo *c*, é possível prever uma sequência única de bases do seu mRNA codificante? Justifique a sua resposta.

4. Codificação de um polipeptídeo a partir de DNA de dupla-fita A fita-molde de um segmento de DNA dupla-hélice contém a sequência

(5') CTTAACACCCCTGACTTCGCGCCGTCG(3')

- Qual é a sequência de bases do mRNA que pode ser transcrita a partir dessa fita?
- Que sequência de aminoácidos poderia ser codificada pelo mRNA em (a), iniciando na extremidade 5'?
- Se a fita complementar (não molde) desse DNA fosse transcrita e traduzida, a sequência de aminoácidos resultante seria a mesma que em (b)? Explique o significado biológico da sua resposta.

5. A metionina tem apenas um códon A metionina é um dos dois aminoácidos com apenas um códon. Como é que o único códon que codifica a metionina especifica tanto o resíduo inicial como os resíduos de Met internos dos polipeptídeos sintetizados pela *E. coli*?

6. O código genético em ação Traduza o seguinte mRNA, começando no primeiro nucleotídeo 5' e considerando que a tradução ocorra em uma célula de *E. coli*. Se todos os tRNA aproveitam ao máximo as regras de oscilação, mas não têm inosina, quantos tRNA diferentes seriam necessários para traduzir esse RNA??

(5')AUGGGUCGUGAGUCAUCGUUAAUUG
UAGCUGGAGGGGAGGAAUGA(3')

7. mRNA sintéticos O código genético foi elucidado utilizando-se polirribonucleotídeos sintetizados enzimática ou quimicamente em laboratório. Considerando-se o atual conhecimento sobre o código genético, como é que se poderia fazer um polirribonucleotídeo que pudesse servir como um mRNA codificando predominantemente muitos resíduos Phe e um pequeno número de resíduos Leu e Ser? Qual ou quais outros aminoácidos seriam codificados por esse polirribonucleotídeo, embora em quantidades menores?

8. Custo energético da biossíntese de proteínas Determine o mínimo de energia necessário, em termos de equivalentes de ATP utilizados, para a biossíntese da cadeia de β -globina da hemoglobina (146 resíduos), tendo como componentes de partida todos os aminoácidos necessários, ATP e GTP. Compare a resposta com a quantidade de energia gasta para a biossíntese de uma cadeia linear de glicogênio de 146 resíduos de glicose unidos por ligações ($\alpha 1 \rightarrow 4$), a partir de um conjunto de precursores incluindo glicose, UTP e ATP (Capítulo 15). Com base nos seus dados, qual é o custo *extra* de energia para se produzir uma proteína na qual todos os resíduos estão ordenados em uma sequência específica, quando comparado com o custo de se produzir um polissacarídeo com o mesmo número de resíduos, mas sem o conteúdo de informação da proteína?

Além do custo direto de energia para a síntese de uma proteína, existem gastos indiretos de energia – aqueles necessários para que a célula produza as enzimas necessárias para a síntese proteica. Compare a magnitude dos custos indiretos para que uma célula eucariótica realize a biossíntese de cadeias de glicogênio lineares ($\alpha 1 \rightarrow 4$) e a biossíntese de polipeptídeos, em termos de maquinarias enzimáticas envolvidas.

9. Pressupondo anticódons a partir de códons A maioria dos aminoácidos tem mais de um códon e se liga a mais de um tRNA, cada qual com um anticódon diferente. Escreva todos os anticódons possíveis para os quatro códons de glicina: (5')GGU, GGC, GGA e GGG.

- (a) Com base na resposta, quais posições, nos anticódons, são os principais determinantes para a especificidade dos seus códons, no caso da glicina?
- (b) Qual(is) pareamento(s) códon-anticódon possui(em) um par de bases oscilante?
- (c) Em qual dos pareamentos códon-anticódon todas as três posições apresentam fortes ligações de hidrogênio de Watson-Crick?

10. Efeito das mudanças em uma única base para a sequência de aminoácidos Muitas evidências importantes que confirmam o código genético surgiram analisando-se as mudanças nas sequências de aminoácidos de proteínas mutantes após a alteração de uma única base no gene que codifica a proteína. Quais das seguintes substituições de aminoácidos seriam consistentes com o código genético no caso de as alterações terem sido causadas pela mudança de uma única base? Quais não resultam de uma única mudança de base? Por quê?

- (a) Phe → Leu (e) Ile → Leu
(b) Lys → Ala (f) His → Glu
(c) Ala → Thr (g) Pro → Ser
(d) Phe → Lys

11. A resistência do código genético às mutações A sequência de RNA a seguir representa o início de uma fase de leitura. Que alterações podem ocorrer em cada posição sem que haja mudança no aminoácido codificado?

(5') AUGAUUUGCUAUCUUGGACU

12. Princípio da mutação das células falciformes A hemoglobina das células falciformes tem um resíduo de Val na posição 6 da cadeia do β -globina, em vez do resíduo de Glu encontrado na hemoglobina A normal. Você seria capaz de prever qual mudança ocorreu no códon de DNA para glutamato que causou a substituição do Glu pela Val?

13. A revisão pelas aminoacil-tRNA-sintetases A isoleucil-tRNA-sintetase apresenta uma atividade de revisão que garante a fidelidade da reação de aminoacilação, mas a histidil-tRNA-sintetase não tem essa atividade. Explique.

14. A importância de um “segundo código genético” Algumas aminoacil-tRNA-sintetases não reconhecem e não se ligam ao anticódon de seus tRNA correspondentes, mas usam outras características estruturais dos tRNA para conferir a especificidade de ligação. Os tRNA para alanina aparentemente se encaixam nessa categoria.

- (a) Quais características do tRNA^{Ala} são reconhecidas pela Ala-tRNA-sintetase?
- (b) Descreva as consequências da mutação C→G na terceira posição do anticódon do tRNA^{Ala}.
- (c) Que outros tipos de mutação podem ter efeitos semelhantes?
- (d) Mutações desses tipos nunca são encontradas em populações naturais de organismos. Por quê? (Dica: considere o que poderia ocorrer tanto em proteínas individuais como no organismo como um todo.)

15. Velocidade da síntese proteica Um ribossomo de bactéria sintetiza cerca de 20 ligações peptídicas por minuto. Caso as proteínas de bactérias tenham um comprimento médio de 260 resíduos de aminoácidos, quantas proteínas os ribossomos de *E. coli* poderiam sintetizar em 20 minutos caso todos os ribossomos funcionassem em capacidade máxima?

16. O papel dos fatores de tradução Um pesquisador isolou variantes mutantes dos fatores de transcrição bacterianos IF2, EF-Tu e EF-G. Em cada caso, a mutação permite o

enovelamento apropriado da proteína e a ligação de GTP, mas não permite a hidrólise do GTP. Em qual etapa a tradução seria bloqueada por cada proteína mutante?

17. Mantendo a fidelidade da síntese proteica Os mecanismos químicos utilizados para evitar erros na síntese proteica são diferentes daqueles utilizados durante a replicação do DNA. As DNA-polimerases fazem uso da atividade de revisão exonucleásica 3'→5' para remover nucleotídeos pareados incorretamente inseridos em uma fita de DNA nascente. Não existe função de revisão análoga nos ribossomos, e, de fato, a identidade de um aminoácido em um tRNA que chega no ribossomo e que é ligado ao polipeptídeo nascente nunca é conferida. Uma etapa de revisão que hidrolisasse a ligação peptídica previamente formada no peptídeo nascente com um aminoácido incorreto (de maneira semelhante à etapa de revisão da DNA-polimerase) seria inviável. Por quê? (Dica: considere como a ligação entre o polipeptídeo nascente e o mRNA é mantida durante o alongamento; ver Figuras 27-29 e 27-30.)

18. Perfil ribossômico No método de perfil ribossômico (Figura 27-37), segmentos de mRNA que estão ligados a ribossomos, e, assim, protegidos, são isolados e convertidos em DNA para serem sequenciados. Contudo, os segmentos de mRNA geralmente são apenas parte do total de RNA protegido por ribossomos e isolados após o tratamento. Quais são as outras formas de RNA que são isoladas com o uso desse protocolo?

19. Deduzindo a localização celular de uma proteína O gene para um polipeptídeo eucariótico de 300 resíduos de aminoácidos é alterado, de forma que ele passa a ter uma sequência-sinal reconhecida pela SRP na extremidade aminoterminal do polipeptídeo, e um sinal de localização nuclear (NLS) na região interna, iniciando no resíduo 150. Em que local da célula essa proteína provavelmente será encontrada?

20. Exigências para o transporte de proteínas através da membrana A proteína OmpA secretada por bactérias tem um precursor, ProOmpA, que tem a sequência-sinal aminoterminal necessária para a secreção. Se ProOmpA purificada for desnaturada com ureia 8 M, e a ureia for posteriormente removida (p. ex., passando rapidamente a solução de proteína por uma coluna de gel-filtração), a proteína pode ser transportada, *in vitro*, através de membranas bacterianas internas isoladas. No entanto, o transporte se torna impossível se a ProOmpA for primeiro incubada por algumas horas na ausência de ureia. Além disso, a capacidade de transporte é mantida por um período mais longo se a ProOmpA for antes incubada na presença de outra proteína bacteriana, denominada fator de desencadeamento. Descreva a provável função desse fator.

21. Capacidade de codificação de proteínas de um DNA viral O genoma de 5.386 pb do bacteriófago ϕ X174 inclui genes para 10 proteínas, denominadas de A a K (excluindo “I”, cujos tamanhos estão apresentados na tabela a seguir. Quanto DNA seria necessário para codificar essas 10 proteínas? Como você conciliaria o tamanho do genoma do ϕ X174 com a sua capacidade de codificar proteínas?

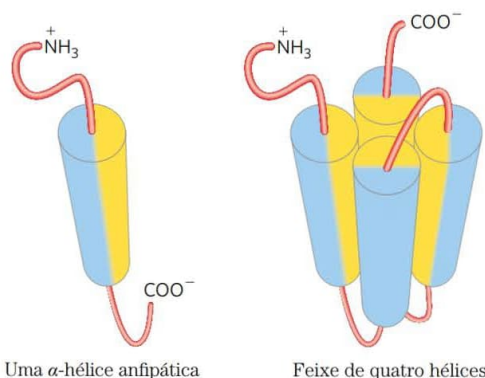
Proteína	Número de resíduos de aminoácidos	Proteína	Número de resíduos de aminoácidos
A	455	F	427
B	120	G	175
C	86	H	328
D	152	J	38
E	91	K	56

Problema de análise de dados

22. Planejando proteínas usando genes gerados ao acaso Estudos acerca das seqüências de aminoácidos e das correspondentes estruturas tridimensionais de proteínas nativas e mutantes levaram a elucidações significativas sobre os princípios que governam o enovelamento das proteínas. Uma maneira importante para testar essas ideias seria *planejar* uma proteína com base nesses princípios e verificar se ela se enovela conforme esperado.

Kamtekar e colaboradores (1993) se basearam em aspectos do código genético para gerar seqüências aleatórias de proteínas, com padrões definidos de resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos. A abordagem elegante empregada combinava o conhecimento acerca da estrutura das proteínas, das propriedades dos aminoácidos e do código genético para investigar fatores que influenciam a estrutura das proteínas.

Os pesquisadores organizam o sistema para gerar proteínas com as estruturas de feixes de quatro hélices mostradas a seguir, com α -hélices (mostradas por cilindros) ligadas por segmentos aleatórios (em vermelho-claro).



Cada α -hélice é anfipática – os grupos R de um lado da hélice são exclusivamente hidrofóbicos (em amarelo) e os do outro lado são exclusivamente hidrofílicos (em azul). Seria de se esperar que uma proteína formada por quatro dessas hélices, separadas por segmentos curtos de alças aleatórias, se enovelasse de forma que os lados hidrofílicos das hélices fiquem voltados para o solvente.

- (a) Que forças ou interações mantêm as quatro α -hélices unidas nessa estrutura?

A Figura 4.4a mostra um segmento de α -hélice formado por 10 resíduos de aminoácidos. Com o bastão central cinza atuando como um divisor, quatro dos grupos R (esferas em púrpura) se estendem a partir do lado esquerdo da hélice e seis a partir do lado direito.

- (b) Numere os grupos R na Figura 4-4a, da parte superior (aminoterminal; 1) para a parte inferior (carboxiterminal; 10). Quais grupos R se estendem a partir do lado esquerdo e quais a partir do lado direito?
- (c) Suponha que se queira planejar modificações nesse segmento de 10 aminoácidos para se obter uma hélice anfipática, com o lado esquerdo hidrofílico e o lado direito hidrofóbico. Forneça uma seqüência de 10 aminoácidos que potencialmente se enovelaria, formando uma estrutura assim. Muitas respostas corretas são possíveis.
- (d) Forneça uma seqüência de DNA de dupla-fita que poderia codificar a seqüência de aminoácidos escolhida em (c).

(Sendo a região interna de uma proteína, não é necessário incluir códons de início nem de término.)

Em vez de planejar proteínas com seqüências específicas, Kamtekar e colaboradores planejaram proteínas com seqüências parcialmente aleatórias, com resíduos de aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos posicionados segundo um padrão controlado. Para isso, eles utilizaram algumas características interessantes do código genético para construir uma biblioteca de moléculas de DNA sintético com seqüências parcialmente aleatórias, organizadas segundo um padrão específico.

Para planejar uma seqüência de DNA que codificasse seqüências aleatórias de aminoácidos hidrofóbicos, os pesquisadores iniciaram pelo códon degenerado NTN, no qual N pode ser A, G, C ou T. Eles preencheram cada posição N incluindo uma mistura equimolar de A, G, C e T na reação de síntese de DNA para gerar uma mistura de moléculas de DNA com diferentes nucleotídeos nesta posição (ver Figura 8-32). De forma semelhante, para codificar seqüências aleatórias de aminoácidos polares, eles partiram do códon degenerado NAN e usaram uma mistura equimolar de A, G e C (mas, nesse caso, sem o T) para preencher as posições N.

- (e) Quais aminoácidos podem ser codificados pelo triplete NTN? Nesse grupo, todos os aminoácidos são hidrofóbicos? O grupo inclui *todos* os aminoácidos hidrofóbicos?
- (f) Quais aminoácidos podem ser codificados pelo triplete NAN? Todos esses aminoácidos são polares? O grupo inclui *todos* os aminoácidos polares?
- (g) Por que, ao criar os códons NAN, foi necessário deixar T fora da mistura de reação?

Kamtekar e colaboradores clonaram essa biblioteca de seqüências aleatórias de DNA em plasmídeos, selecionaram 48 que produziam o padrão correto de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos e os expressaram em *E. coli*. O desafio seguinte foi determinar se as proteínas se enovelavam conforme o esperado. Seria muito demorado expressar cada proteína, cristalizá-las e determinar a estrutura tridimensional completa de cada uma. Em vez disso, os pesquisadores utilizaram a maquinaria de processamento proteico de *E. coli* para excluir as seqüências que levavam à produção de proteínas muito defeituosas. Nessa fase seletiva inicial, eles mantiveram apenas aqueles clones que resultaram em uma banda de proteínas com o peso molecular esperado quando analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (ver Figura 3-18).

- (h) Por que uma proteína grosseiramente mal enovelada não formaria uma banda com o peso molecular esperado, quando analisada eletroforeticamente?

Várias proteínas passaram nesse teste inicial, e análises mais aprofundadas mostraram que elas apresentavam, de fato, a estrutura prevista de quatro hélices.

- (i) Por que nem todas as proteínas com seqüências aleatórias que passaram no primeiro teste seletivo produziram estruturas de quatro hélices?

Referência

Kamtekar, S., J.M. Schiffer, H. Xiong, J.M. Babik e M.H. Hecht. 1993. Protein design by binary patterning of polar and nonpolar amino acids. *Science* 262:1680–1685.

Regulação da expressão gênica

- 28.1** Princípios da regulação gênica 1128
28.2 Regulação da expressão gênica em bactérias 1138
28.3 Regulação da expressão gênica em eucariotos 1147

Dos aproximadamente 4 mil genes existentes em um genoma bacteriano típico, ou dos 20 mil genes no genoma humano, apenas uma fração é expressa em determinada célula em dado momento. Alguns produtos gênicos estão presentes em grandes quantidades: os fatores de alongamento necessários à síntese de proteínas, por exemplo, estão entre as proteínas mais abundantes em bactérias, e a ribulose-1,5-bisfosfato-carboxilase/oxigenase (rubisco) de plantas e bactérias fotossintéticas é uma das enzimas mais abundantes na biosfera. Outros produtos gênicos ocorrem em quantidades muito menores; por exemplo, uma célula pode conter apenas poucas moléculas de enzimas que reparam lesões raras do DNA. As necessidades de certos produtos gênicos mudam ao longo do tempo. A necessidade de enzimas em certas vias metabólicas aumenta ou diminui à medida que as fontes de alimentos mudam ou se esgotam. Durante o desenvolvimento de um organismo pluricelular, algumas proteínas que influenciam a diferenciação celular estão presentes apenas por um breve período em apenas poucas células. A especialização da função celular afeta drasticamente a necessidade de vários produtos gênicos. Um exemplo é a concentração excepcionalmente elevada de uma única proteína – a hemoglobina – nos eritrócitos. Devido ao alto custo da síntese proteica, a regulação da expressão gênica é essencial para otimizar a utilização da energia disponível.

A concentração celular de uma proteína é determinada pelo equilíbrio fino entre, pelo menos, sete processos, cada um com vários pontos potenciais de regulação:

1. Síntese do transcrito primário de RNA (transcrição).
2. Modificação pós-transcricional do mRNA.
3. Degradação de mRNA.
4. Síntese proteica (tradução).
5. Modificação pós-traducional de proteínas.
6. Direcionamento e transporte de proteínas.
7. Degradação de proteínas.

Esses processos estão resumidos na **Figura 28-1**. Vários desses mecanismos foram examinados em capítulos anteriores. A modificação pós-transcricional do mRNA por processos como padrões alternativos de *splicing* (ver Figura 26-19b) ou edição de RNA (ver Figuras 27-10, 27-12) pode afetar quais proteínas são produzidas a partir de um transcrito de mRNA e em que quantidades. Uma grande variedade de sequências de nucleotídeos em um mRNA pode afetar a velocidade da sua degradação (p. 1014). Muitos fatores afetam a velocidade em que um mRNA é traduzido em uma proteína, bem como a modificação pós-traducional, direcionamento e, por fim, a degradação dessa proteína (Capítulo 27).

Dos processos regulatórios ilustrados na Figura 28-1, aqueles operando no nível da iniciação da transcrição estão especialmente bem-documentados. Esses processos são o principal foco desse capítulo, embora outros mecanismos também sejam abordados. Nos capítulos anteriores, foi mostrado que a complexidade de um organismo não se reflete no número dos genes que codificam para proteínas. Em vez disso, à medida que a complexidade aumenta desde as bactérias até os mamíferos, os mecanismos de regulação dos genes tornam-se mais elaborados, e as regulações pós-transcricional e traducional desempenham papéis mais importantes. Para muitos genes, os processos regulatórios podem necessitar de um investimento considerável de energia química.

O controle da iniciação da transcrição permite a regulação sincronizada de vários genes codificando produtos com atividades interdependentes. Por exemplo, quando o DNA bacteriano está muito danificado, as células precisam de um aumento coordenado nos níveis das muitas enzimas de reparo de DNA. E talvez a forma mais sofisticada de coordenação ocorra nos circuitos regulatórios complexos que direcionam o desenvolvimento dos organismos eucarióticos multicelulares e envolvem muitos tipos de mecanismos regulatórios.

Primeiro, são examinadas as interações entre proteínas e DNA que são a chave da regulação da transcrição. Em seguida, são abordadas as proteínas específicas que influenciam a expressão de genes específicos, primeiro em células bacterianas e, então, em células eucarióticas. Quando for

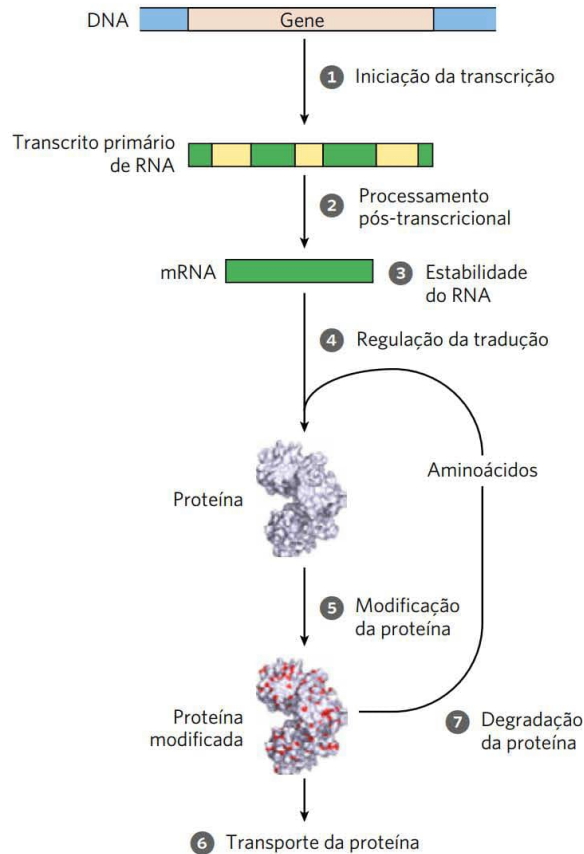


FIGURA 28-1 Sete processos que afetam a concentração do estado estacionário de uma proteína. Cada processo tem vários pontos potenciais de regulação.

relevante, são incluídas informações sobre a regulação pós-transcricional e a regulação de tradução, com o objetivo de fornecer uma visão geral mais completa da complexidade rica dos mecanismos regulatórios.

28.1 Princípios da regulação gênica

Genes de produtos necessários durante todo o tempo, como os das enzimas das vias metabólicas centrais, são expressos em níveis mais ou menos constantes em praticamente todas as células de uma espécie ou de um organismo. Muitas vezes, esses genes são chamados de **genes constitutivos** (*housekeeping genes*). A expressão invariável de um gene é chamada de **expressão gênica constitutiva**.

Para outros produtos gênicos, os níveis celulares aumentam e diminuem em resposta a sinais moleculares; isso é a **expressão gênica regulada**. Produtos gêni-

cos que aumentam de concentração sob circunstâncias moleculares específicas são chamados de **induzíveis**; o processo de aumentar sua expressão é denominado **indução**. A expressão de muitos dos genes que codificam para enzimas de reparo de DNA, por exemplo, é induzida por um sistema de proteínas reguladoras que responde a níveis altos de dano ao DNA. Ao contrário, produtos gênicos cujas concentrações diminuem em resposta a um sinal molecular são denominados **reprimíveis**, e o processo é chamado de **repressão**. Por exemplo, em bactérias, a ampla disponibilidade de triptofano leva à repressão dos genes que codificam as enzimas que catalisam a biossíntese do triptofano.

A transcrição é mediada e regulada por interações proteína-DNA, principalmente aquelas envolvendo os componentes proteicos da RNA-polimerase (Capítulo 26). Primeiro, será considerado como a atividade da RNA-polimerase é regulada e, então, será feita uma descrição geral das proteínas que participam dessa regulação. Depois, serão vistas as bases moleculares do reconhecimento de sequências de DNA específicas por proteínas que se ligam ao DNA.

A RNA-polimerase se liga ao DNA nos promotores

A RNA-polimerase se liga ao DNA e inicia a transcrição nos promotores (ver Figura 26-5), sítios geralmente encontrados no DNA-molde perto dos pontos de início da síntese de RNA. A regulação da iniciação da transcrição envolve geralmente alterações em como a RNA-polimerase interage com um promotor.

As sequências de nucleotídeos de promotores variam consideravelmente, afetando a afinidade de ligação das RNA-polimerases e, portanto, a frequência de iniciação da transcrição. Alguns genes de *Escherichia coli* são transcritos uma vez por segundo, outros menos de uma vez por geração celular. A maior parte dessa variação deve-se a diferenças entre as sequências dos promotores. Na ausência de proteínas regulatórias, diferenças na sequência dos promotores podem afetar a frequência de iniciação da transcrição em mil vezes ou mais. A maioria dos promotores de *E. coli* tem uma sequência que chega perto de um consenso (**Figura 28-2**). Mutações que levam a um desvio da sequência-consenso geralmente diminuem a função de promotores bacterianos, e mutações na direção da sequência-consenso geralmente aumentam a função do promotor.

>> Convenção-chave: por convenção, as sequências de DNA são apresentadas conforme existem na fita não molde, com a terminação 5' escrita à esquerda. Os nucleotídeos são numerados a partir do sítio de iniciação da transcrição, com números positivos à direita (na direção da transcrição) e números negativos à esquerda. N indica qualquer nucleotídeo. <<

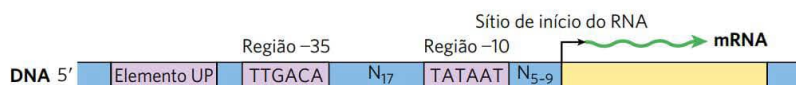


FIGURA 28-2 Sequência-consenso de vários promotores de *E. coli*. A maioria das substituições de bases nas regiões -10 e -35 levam a efeitos negativos na função dos promotores. Alguns promotores também incluem o elemento UP (promotor a montante) (ver Figura 26-5).

Embora os genes constitutivos sejam expressos constitutivamente, as concentrações celulares das proteínas que eles codificam variam amplamente. Para esses genes, a interação entre a RNA-polimerase e o promotor influencia fortemente a velocidade de iniciação da transcrição; diferenças na sequência dos promotores possibilitam que a célula sintetize o nível apropriado de cada produto dos genes constitutivos.

A taxa basal de iniciação da transcrição nos promotores dos genes constitutivos também é determinada pela sequência dos promotores, mas a expressão desses genes é modulada adicionalmente por proteínas regulatórias. Muitas dessas proteínas operam estimulando ou interferindo na interação entre a RNA-polimerase e o promotor.

As sequências dos promotores de organismos eucarióticos são muito mais variáveis do que as sequências correspondentes em bactérias. As três RNA-polimerases de eucariotos geralmente necessitam de um conjunto de fatores de transcrição para que possam se ligar a um promotor e, então, esses fatores podem ter grande influência sobre a velocidade basal da transcrição. Ainda assim, como na expressão gênica bacteriana, o nível basal de transcrição é, em parte, determinado pelo efeito das sequências promotoras no funcionamento da RNA-polimerase e seus fatores de transcrição associados.

A iniciação da transcrição é regulada por proteínas e RNA

Pelo menos três tipos de proteínas regulam a iniciação da transcrição pela RNA-polimerase: os **fatores de especificidade** alteram a especificidade da RNA-polimerase para um determinado promotor ou conjuntos de promotores, os **repressores** impedem o acesso da RNA-polimerase ao promotor e os **ativadores** estimulam a interação entre RNA-polimerase e promotor.

Como o nosso conhecimento sobre os papéis das proteínas reguladoras amadurece lentamente, muitas novidades sobre o papel regulatório desempenhado pelos RNA começam a surgir. Entre eles, destacam-se os **RNA não codificantes longos (lncRNA)**, geralmente definidos como RNA com mais de 200 nucleotídeos de comprimento que não possuem fase aberta de leitura que codifique para proteínas, o que os diferencia dos RNA funcionais pequenos (miRNA, snoRNA, snRNA, etc.), descritos no Capítulo 26. Os lncRNA são encontrados em todos os tipos de organismos e dezenas de milhares deles são expressos nas células de mamíferos. Entre as funções conhecidas dos lncRNA podemos incluir a regulação do posicionamento do nucleossomo e a estrutura da cromatina, o controle da metilação do DNA e a modificação pós-transcricional das histonas, o silenciamento da

transcrição de genes, vários papéis na ativação e repressão da transcrição, entre outros.

Os fatores de especificidade bacterianos foram introduzidos no Capítulo 26 (ver Figura 26-5), embora não tenham sido referidos por esse nome. A subunidade σ da holoenzima RNA-polimerase de *E. coli* é um fator de especificidade que controla o reconhecimento e a ligação ao promotor. A maioria dos promotores de *E. coli* é reconhecida por uma única subunidade σ (M_r 70.000), σ^{70} . Sob certas condições, algumas das subunidades σ^{70} são substituídas por um de seis outros fatores de especificidade. Um caso notável surge quando bactérias são submetidas a estresse térmico, levando a uma substituição de σ^{70} por σ^{32} (M_r 32.000). Quando ligada a σ^{32} , a RNA-polimerase é direcionada a um conjunto especializado de promotores com uma sequência-consenso diferente (**Figura 28-3**). Esses promotores controlam a expressão de um conjunto de genes que codificam proteínas, incluindo algumas chaperonas proteicas (p. 146), que são parte de um sistema induzido por estresse, chamado de resposta de choque térmico. Portanto, por meio de mudanças na afinidade de ligação com a polimerase que a dirigem para diferentes promotores, um conjunto de genes envolvido em processos relacionados entre si é regulado coordenadamente. Em células eucarióticas, alguns dos fatores de transcrição gerais, em particular a proteína de ligação à TATA (TBP; ver Figura 26-9), podem ser considerados como fatores de especificidade.

Os repressores se ligam a sítios específicos no DNA. Em células bacterianas, esses sítios de ligação, chamados de **operadores**, estão geralmente próximos de um promotor. A ligação da RNA-polimerase, ou seu movimento ao longo do DNA após ter se ligado ao DNA, é bloqueada quando o repressor está presente. A regulação pela proteína repressora que bloqueia a transcrição é chamada de **regulação negativa**. A ligação do repressor ao DNA é regulada por um sinal molecular (ou **efetor**), geralmente uma molécula pequena ou uma proteína, que se liga ao repressor e provoca uma mudança conformacional. A interação entre repressor e molécula sinalizadora aumenta ou diminui a transcrição. Em alguns casos, a mudança conformacional resulta na dissociação de um repressor que esteja ligado ao DNA no operador (**Figura 28-4a**). A iniciação da transcrição pode, então, ocorrer sem obstáculos. Em outros casos, a interação entre um repressor inativo e a molécula sinalizadora leva o repressor a se ligar ao operador (Figura 28-4b). Nas células eucarióticas, a regulação de genes por repressores é menos comum. Quando ocorre (com mais frequência em eucariotos inferiores, como leveduras), o sítio de ligação a um repressor pode estar situado a alguma distância do promotor. A ligação desses repressores aos seus respectivos sítios de

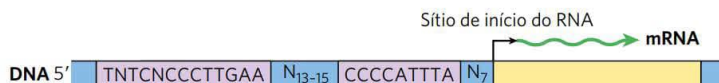


FIGURA 28-3 Sequência-consenso para promotores que regulam a expressão de genes de choque térmico de *E. coli*. Este sistema responde a aumentos de temperatura, bem como a outros estresses ambientais, levando à indução de um conjunto de proteínas. A ligação da RNA-polimerase a promotores de choque térmico é mediada por uma subunidade σ especializada da polimerase, σ^{32} , que substitui σ^{70} no complexo de iniciação da polimerase.

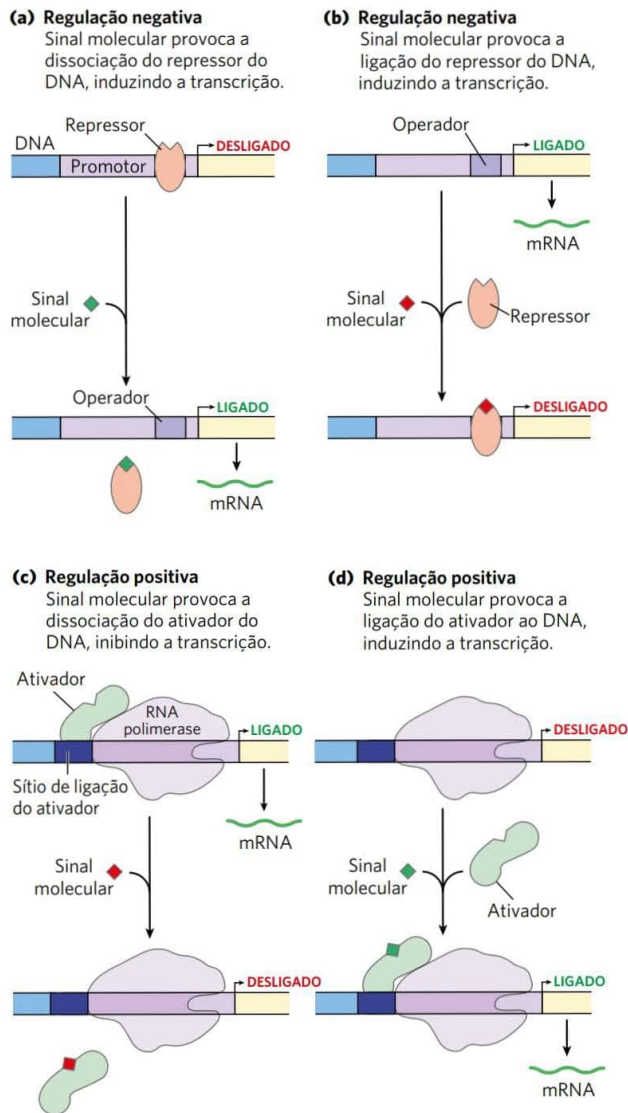


FIGURA 28-4 Padrões comuns de regulação da iniciação da transcrição. Estão ilustrados dois tipos de regulação negativa. **(a)** O repressor se liga ao operador na ausência do sinal molecular; o sinal externo provoca a dissociação do repressor, possibilitando que haja transcrição. **(b)** O repressor se liga na presença do sinal; o repressor se dissocia e a transcrição acontece quando o sinal é removido. A regulação positiva é mediada pelos ativadores do gene. Novamente, estão mostrados dois tipos. **(c)** O ativador se liga na ausência do sinal molecular, e a transcrição prossegue; quando o sinal é adicionado, o ativador se dissocia, e a transcrição é inibida. **(d)** O ativador se liga na presença do sinal; ele se dissocia apenas quando o sinal é removido. Observe que as regulações “positiva” e “negativa” se referem ao tipo de proteína regulatória envolvida: a proteína ligada facilita ou inibe a transcrição. Em qualquer um dos casos, a adição de um sinal molecular aumenta ou diminui a transcrição, dependendo do seu efeito na proteína regulatória.

ligação tem o mesmo efeito que em células bacterianas: inibir a montagem ou a atividade de um complexo de transcrição no promotor.

Os ativadores fornecem um contraponto molecular aos repressores; eles se ligam ao DNA e *estimulam* a atividade da RNA-polimerase em um promotor; trata-se de **regulação positiva**. Em bactérias, muitas vezes, os sítios

de ligação de ativadores estão adjacentes aos promotores e ligados fracamente ou não ligados à RNA-polimerase isolada, de forma que ocorre pouca transcrição na ausência do ativador. Alguns ativadores são geralmente ligados ao DNA, estimulando a transcrição até que a dissociação do ativador seja disparada pela ligação de uma molécula sinalizadora (Figura 28-4c). Em outros casos, o ativador se liga ao DNA apenas após a interação com uma molécula sinalizadora (Figura 28-4d). As moléculas sinalizadoras podem, portanto, aumentar ou diminuir a transcrição, dependendo de como elas afetam o ativador.

A regulação positiva por ativadores é especialmente comum em eucariotos. Muitos ativadores eucarióticos se ligam a sítios do DNA, denominados coativadores, que estão distantes do promotor e afetam a velocidade da transcrição de um promotor que está afastado por milhares de pares de bases.

A distância entre um promotor e o sítio de ligação de um ativador ou repressor é encurtada pela formação de uma alça no DNA entre esses dois sítios (**Figura 28-5**). Em alguns casos, a formação da alça é facilitada por proteínas denominadas **reguladores arquitetonícos** que ligam os

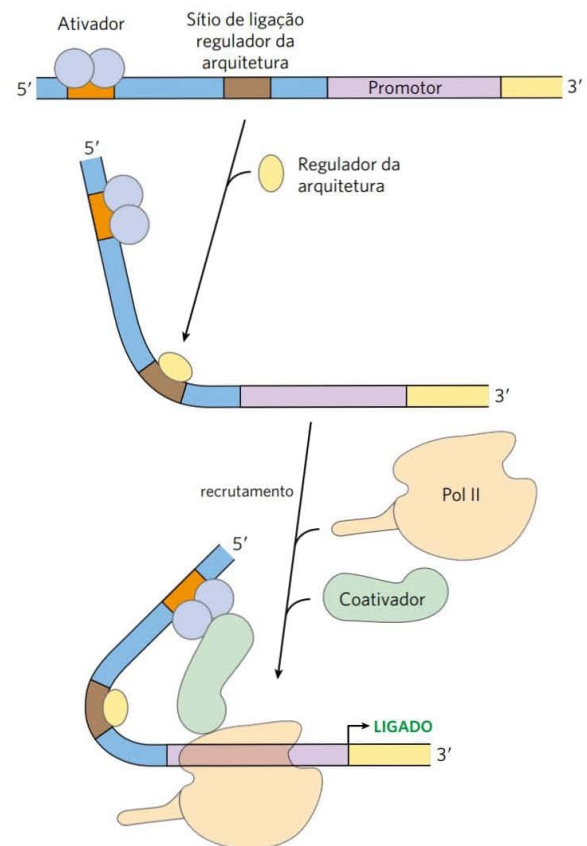


FIGURA 28-5 Interação entre ativadores/repressores com a RNA-polimerase em eucariotos. Os ativadores e repressores de eucariotos geralmente se ligam a locais do DNA situados milhares de pares de bases longe dos promotores que eles regulam. Alças de DNA, muitas vezes facilitadas por reguladores da arquitetura da molécula de DNA, colocam esses sítios em contato. A interação entre ativadores e a RNA-polimerase pode ser mediada por coativadores, como está mostrado. Algumas vezes, a repressão é mediada por repressores (descrito posteriormente) que se ligam a ativadores, impedindo, assim, uma interação ativadora com a RNA-polimerase.



FIGURA 28-6 Óperon representativo de bactérias. Os genes A, B e C são transcritos em um mRNA policistrônico. Sequências regulatórias típicas incluem sítios de ligação para proteínas que ativam ou reprimem a transcrição a partir do promotor.

sítios participantes. As interações entre os ativadores e a RNA-polimerase no promotor são geralmente mediadas por proteínas intermediárias, denominadas coativadores. Em alguns casos, repressores proteicos podem tomar o lugar de coativadores, ligando-se aos ativadores e impedindo uma interação ativadora.

Muitos genes bacterianos são agrupados e regulados em óperons

As bactérias têm um mecanismo geral simples para coordenar a regulação de vários genes: esses genes estão agrupados nos cromossomos e são transcritos em conjunto. Muitos mRNA bacterianos são policistrônicos – vários genes em um único transcrito –, e o único promotor que inicia a transcrição do grupo de genes é o local de regulação para a expressão de todos os genes do grupo. O grupo de genes e o promotor, acrescido de sequências adicionais que funcionam juntas na regulação, são chamados de **óperons** (Figura 28-6). Óperons que incluem 2 a 6 genes transcritos como uma unidade são comuns; alguns óperons contêm 20 ou mais genes. A identidade e a ordem dos genes presentes em um óperon não são aleatórias. Em muitos casos, genes de um mesmo óperon codificam subunidades de complexos proteicos grandes, e a cotradução permite diretamente a montagem do complexo. Alguns óperons organizam genes envolvidos em processos relacionados que necessitam de uma regulação coordenada. Em outros casos, os genes podem parecer não relacionados, porém codificam produtos necessários para a célula em condições semelhantes.

Muitos dos princípios da expressão dos genes bacterianos foram definidos pela primeira vez em estudos do metabolismo da lactose em *E. coli*, que pode usar lactose como única fonte de carbono. Em 1960, François Jacob e Jacques Monod publicaram um breve artigo no periódico *Proceedings* da



François Jacob, 1920-2013
[Fonte: Corbis/Bettmann.]



Jacques Monod, 1910-1976
[Fonte: Corbis/Bettmann.]

Academia Francesa de Ciências, descrevendo como dois genes adjacentes envolvidos no metabolismo da lactose eram regulados coordenadamente por um elemento genético localizado em uma extremidade do grupo de genes. Os genes eram os da β -galactosidase, que quebra a lactose em galactose e glicose, e os da galactosídeo-permease (lactose-permease, p. 418), que transporta lactose para dentro da célula (Figura 28-7). Os termos “óperon” e “operador” foram introduzidos pela primeira vez nesse artigo. Com o modelo óperon, a regulação gênica pode, pela primeira vez, ser considerada em termos moleculares.

O óperon *lac* está sujeito à regulação negativa

O óperon da lactose (*lac*) (Figura 28-8a) inclui os genes para β -galactosidase (*Z*), galactosídeo-permease (*Y*) e tiogalactosídeo-transacetilase (*A*). A última dessas enzimas parece modificar os galactosídeos tóxicos para facilitar sua remoção da célula. Cada um dos três genes é precedido por um sítio de ligação a ribossomos (não mostrado na Figura 28-8) que direciona independentemente a tradução da-

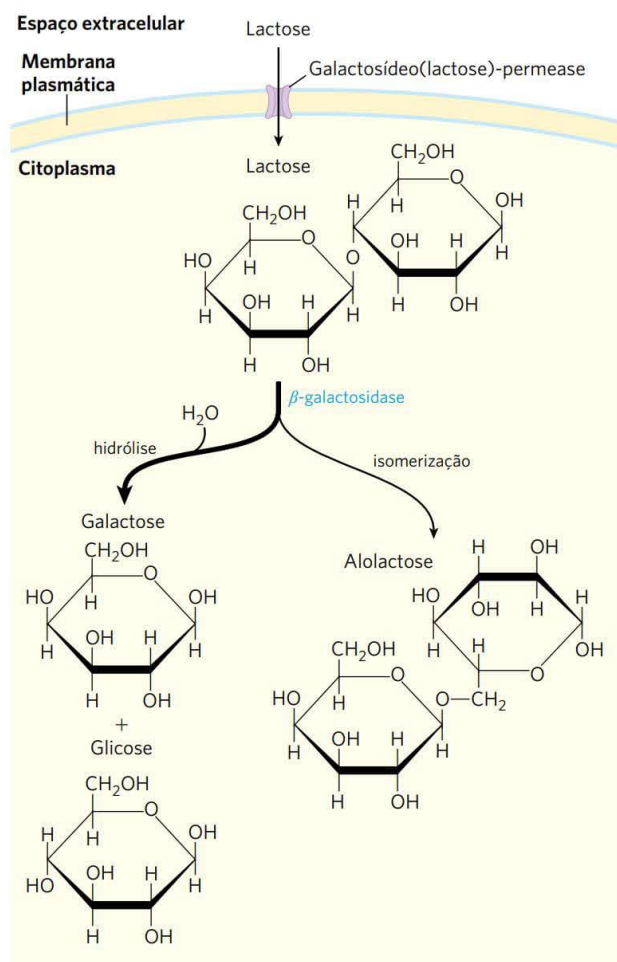


FIGURA 28-7 Metabolismo da lactose em *E. coli*. A absorção e o metabolismo de lactose precisam das atividades da galactosídeo(lactose)-permease e β -galactosidase. A conversão da lactose em alolactose por transglicosilação é uma reação secundária também catalisada pela β -galactosidase.

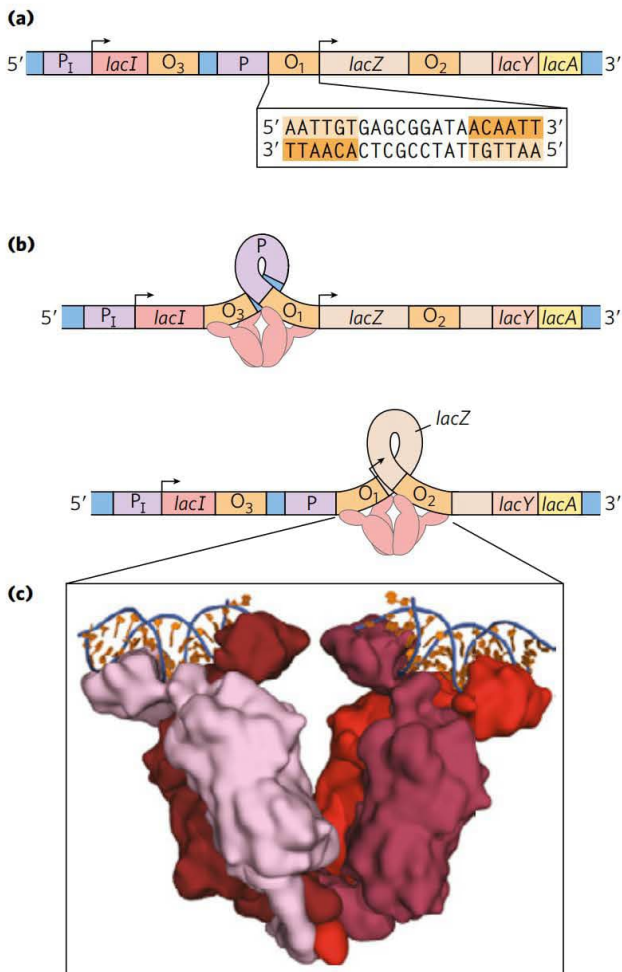


FIGURA 28-8 O operon *lac*. (a) No operon *lac*, o gene *lacI* codifica o repressor Lac. Os genes *lacZ*, *Y* e *A* codificam a β -galactosidase, a galactosídeo-permease e a tiogalactosídeo-transacetilase, respectivamente. P_1 é o promotor dos genes *lac* e P_2 é o promotor do gene *I*. O_1 é o principal operador no operon *lac*; O_2 e O_3 são operadores secundários com menor afinidade pelo repressor Lac. A repetição invertida, na qual o repressor Lac se liga no O_1 , está mostrada. (b) O repressor Lac se liga ao operador principal e ao O_2 ou ao O_3 e parece fazer uma alça no DNA. (c) O repressor Lac (tons de vermelho) está mostrado ligado a um segmento pequeno e descontínuo de DNA (em azul e cor de laranja). [Fonte: (c) PDB ID 2PE5, R. Dabir et al., *J. Mol. Biol.* 370:609, 2007.]

quele gene (Capítulo 27). A regulação do operon *lac* pela proteína repressora do *lac* (Lac) segue o padrão destacado na Figura 28-4a.

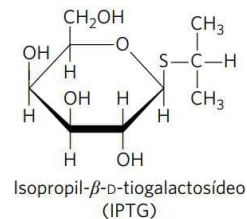
O estudo de mutantes do operon *lac* revelou alguns detalhes das atividades do sistema regulatório do operon. Na ausência de lactose, os genes do operon *lac* são reprimidos. Mutações no operador ou em um outro gene, o gene *I*, resultam na síntese constitutiva de produtos gênicos. Quando o gene *I* está defeituoso, a repressão pode ser restaurada introduzindo-se um gene *I* funcional na célula em outra molécula de DNA, demonstrando que o gene *I* codifica uma molécula difusível que provoca a repressão gênica. Foi de-

monstrado que essa molécula é uma proteína, agora chamada de repressor Lac, um tetrâmero de monômeros idênticos. O operador ao qual ela se liga mais fortemente (O_1) é adjacente ao sítio de início da transcrição (Figura 28-8a). O gene *I* é transcrito a partir de um promotor próprio (P_1), independente dos genes do operon *lac*. O operon *lac* tem dois sítios secundários de ligação ao repressor Lac, O_2 e O_3 . O O_2 localiza-se centrado perto da posição + 410, junto com o gene que codifica para a β -galactosidase (*Z*); o O_3 localiza-se perto da posição - 90, junto ao gene *I*. Para reprimir o operon, o repressor Lac parece ligar-se tanto ao operador principal quanto a um de dois sítios secundários, com o DNA interveniente formando uma alça para o lado de fora (Figura 28-8b, c). Qualquer uma das duas ligações bloqueia a iniciação da transcrição.

Apesar desse elaborado complexo de ligação, a repressão não é absoluta. A ligação do repressor Lac reduz a velocidade de iniciação da transcrição em 10^3 vezes. Se os sítios O_2 e O_3 forem eliminados por deleção ou mutação, apenas a ligação do repressor a O_1 reduz a transcrição em cerca de 10^2 vezes. Mesmo no estado reprimido, cada célula tem algumas poucas moléculas de β -galactosidase e galactosídeo-permease, presumivelmente sintetizadas nas raras ocasiões em que o repressor se dissocia dos operadores. Esse nível basal de transcrição é essencial para a regulação do operon.

Quando as células têm suprimento de lactose, o operon *lac* é induzido. Uma molécula indutora (sinal) liga-se a um sítio específico no repressor Lac, provocando uma alteração conformacional que resulta na dissociação do repressor do operador. O indutor no sistema operon *lac* não é a própria lactose, mas a alolactose, um isômero da lactose (Figura 28-7). Depois de entrar na célula de *E. coli* (por meio das poucas moléculas de lactose-permease existentes), a lactose é convertida em alolactose por uma das poucas moléculas existentes de β -galactosidase. A liberação do operador pelo repressor Lac, disparada à medida que o repressor se liga à alolactose, permitindo a expressão dos genes do operon *lac* e levando a um aumento de 10^3 vezes na concentração de β -galactosidase.

Vários β -galactosídeos com estrutura semelhante à alolactose induzem o operon *lac*, mas não são substratos para a β -galactosidase, ao passo que outros são substratos, mas não são indutores. Um indutor muito eficaz e não metabolizável do operon *lac*, frequentemente usado de modo experimental, é o isopropil-tiogalactosídeo (IPTG).



Um indutor que não pode ser metabolizado permite que os pesquisadores explorem a função fisiológica da lactose como uma fonte de carbono para o crescimento, separada da sua função na regulação da expressão gênica.

Além da infinidade de óperons agora conhecidos em bactérias, apenas poucos óperons policistrônicos foram encontrados nas células de eucariotos inferiores. Nas células dos eucariotos superiores, quase todos os genes codificados de proteínas são transcritos separadamente.

Os mecanismos pelos quais os óperons são regulados podem variar significativamente em relação ao modelo simples apresentado na Figura 28-8. Mesmo o óperon *lac* é mais complexo do que indicado aqui, com um ativador contribuindo também para o esquema geral, como será visto na Seção 28.2. Antes de qualquer discussão adicional sobre os níveis de regulação da expressão gênica, entretanto, serão examinadas as interações moleculares cruciais entre as proteínas de ligação do DNA (como repressores e ativadores) e as sequências de DNA às quais elas se ligam.

As proteínas regulatórias têm domínios de ligação de DNA discretos

As proteínas regulatórias geralmente se ligam a sequências de DNA específicas. Suas afinidades por essas sequências-alvo são aproximadamente 10^4 a 10^6 vezes maiores que as afinidades por qualquer outra sequência de DNA. A maioria das proteínas regulatórias apresenta distintos domínios de ligação de DNA contendo subestruturas que interagem estreita e especificamente com o DNA. Esses domínios de ligação geralmente incluem um ou mais membros de um grupo relativamente pequeno de motivos estruturais característicos e reconhecíveis.

Para se ligarem especificamente a sequências de DNA, as proteínas regulatórias devem reconhecer características presentes na superfície do DNA. A maioria dos grupos químicos que diferem entre as quatro bases e, portanto, permitem a distinção entre pares de bases consiste em grupos doadores e aceptores de ligações de hidrogênio expostos no sulco maior do DNA (**Figura 28-9**), e a maior parte dos contatos proteína-DNA que conferem especificidade consiste em ligações de hidrogênio. Uma exceção notável é a superfície apolar próxima do C-5 de pirimidinas, onde a timina é prontamente diferenciada da citosina devido ao seu grupo metila protuberante. Os contatos proteína-DNA também são possíveis no sulco menor do DNA, mas os padrões de ligações de hidrogênio nesse local geralmente não permitem uma pronta distinção entre os pares de bases.

No interior de proteínas regulatórias, as cadeias laterais de aminoácidos com ligações de hidrogênio mais frequentes com as bases no DNA são aquelas de resíduos de Asn, Gln, Glu, Lys e Arg. Existe um código de reconhecimento simples em que um aminoácido específico sempre pareie com uma base específica? As duas ligações de hidrogênio que podem se formar entre Gln ou Asn e as posições N^6 e $N-7$ da adenina não podem se formar com qualquer outra base, e um resíduo de Arg pode formar duas ligações de hidrogênio com $N-7$ e O^6 da guanina (**Figura 28-10**). O exame da estrutura de muitas proteínas de ligação do DNA, entretanto, mostrou que uma proteína pode reconhecer cada par de bases de mais de uma maneira, levando à conclusão de que

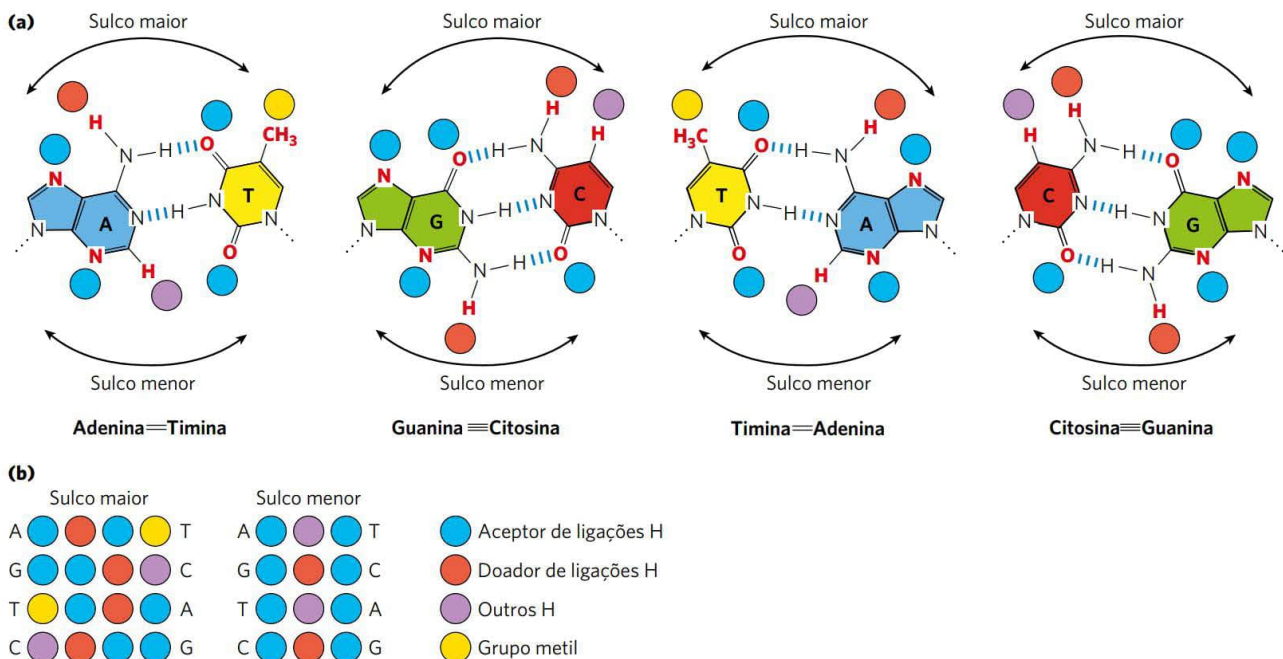


FIGURA 28-9 Grupos no DNA disponíveis para ligação com proteínas. (a) Estão mostrados grupos funcionais em todos os quatro pares de bases exibidos nos sulcos maior e menor do DNA (ver Figura 8-13). Átomos aceptores e doadores de ligações de hidrogênio estão marcados por discos azuis ou vermelhos, respectivamente. Outros átomos de hidrogênio estão marcados com discos roxos e grupos metila com discos amarelos. (b) Padrões de reconhecimento para cada par de bases (da esquerda para a direita). A variação muito maior em padrões para o sulco maior dá origem a um poder diferenciador muito maior no sulco maior em relação ao sulco menor. [Fonte: informação de L. Huret, *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.*, 2006, <http://atlasgeneticsoncology.org/Educ/DNAEngID30001ES.html>.]

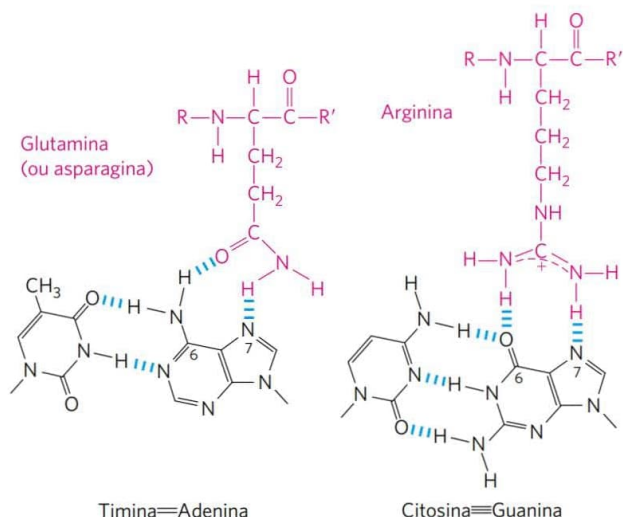


FIGURA 28-10 Interações específicas entre resíduos de aminoácidos e pares de bases. Os dois exemplos mostrados foram observados na ligação proteína-DNA.

não há um código simples de aminoácidos. No caso de algumas proteínas, a interação Gln-adenina pode especificar um par de base A=T e, em outras proteínas, um bolsão de van der Waals para o grupo metila da timina pode reconhecer um par de bases A=T. Os pesquisadores ainda não conseguem examinar a estrutura de uma proteína de ligação do DNA e inferir a sequência de DNA à qual ela se liga.

Para interagir com as bases no sulco maior do DNA, uma proteína precisa de uma subestrutura relativamente pequena que possa formar uma protuberância de modo estável a partir da superfície da proteína. Os domínios de ligação de DNA das proteínas regulatórias tendem a ser pequenos (60 a 90 resíduos de aminoácidos) e os motivos estruturais no interior desses domínios que estão, na verdade, em contato com o DNA são ainda menores. Muitas proteínas pequenas são instáveis devido à capacidade limitada que têm de formar camadas de estrutura para ocultar os grupos hidrofóbicos. Os motivos de ligação ao DNA fornecem uma estrutura estável muito compacta ou uma maneira de permitir que um segmento de proteína se projete a partir da superfície da proteína.

Os sítios de ligação do DNA para proteínas regulatórias são frequentemente repetições invertidas de uma pequena sequência de DNA (palíndromo) em que várias (geralmente duas) subunidades de uma proteína regulatória se ligam cooperativamente. O repressor Lac é incomum pelo fato de funcionar como tetrâmero, com dois dímeros unidos presos na extremidade distante dos sítios de ligação do DNA (Figura 28-8b). Uma célula de *E. coli* pode, em geral, conter cerca de 20 tetrâmeros do repressor Lac. Cada um dos dímeros unidos liga-se separadamente a uma sequência operadora palindrômica, em contato com 17 pb de uma região de 22 pb no operon *lac*. Cada um dos dímeros unidos pode se ligar independentemente a uma sequência operadora, com um geralmente se ligando a O_1 e o outro a O_2 ou O_3 (como na Figura 28-8b). A simetria da sequência operadora O_1 corresponde ao eixo duplo de simetria das duas subunidades repressoras do Lac pareadas. O repressor Lac tetramérico

liga-se à sua sequência receptora *in vivo* com uma constante de dissociação estimada em 10^{-10} M. O repressor discrimina entre operadores e outras sequências por um fator de cerca de 10^6 , de modo que a ligação a esses poucos pares de bases entre os cerca de 4,6 milhões presentes nos cromossomos de *E. coli* é altamente específica.

Vários motivos de ligação ao DNA foram descritos, porém serão focados dois que desempenham papéis importantes na ligação de proteínas regulatórias ao DNA em todos os ramos da vida: hélice-volta-hélice e dedo de zinco. Também serão considerados outros dois motivos desse tipo: o homeodomínio e o motivo de reconhecimento de RNA, que, como o nome indica, também liga RNA; esses dois motivos desempenham papéis importantes em algumas proteínas regulatórias de organismos eucarióticos.

Hélice-volta-hélice O motivo **hélice-volta-hélice** é fundamental para interação de muitas proteínas regulatórias com o DNA em bactérias e motivos semelhantes ocorrem em algumas proteínas regulatórias de eucariotos. A hélice-volta-hélice compreende cerca de 20 resíduos de aminoácidos em dois pequenos segmentos de α -hélice, cada um com comprimento entre 7 a 9 resíduos, separados por uma volta β (Figura 28-11). Essa estrutura geralmente não é estável por si só; ela é simplesmente a parte reativa de um domínio de ligação ao DNA um pouco maior. Um dos dois segmentos

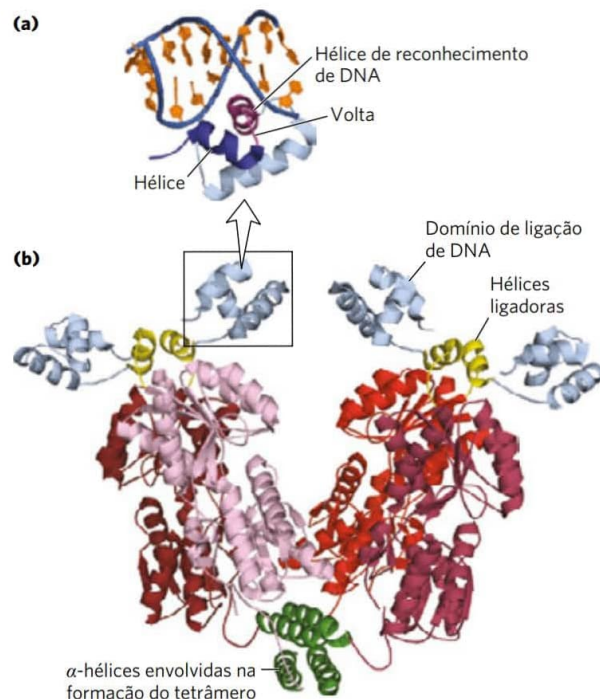


FIGURA 28-11 Hélice-volta-hélice. (a) Domínio de ligação ao DNA do operon Lac ligado ao DNA (em azul e cor de laranja). O motivo hélice-volta-hélice está indicado em azul-escuro e roxo, e a hélice de reconhecimento do DNA, em roxo. (b) Repressor Lac inteiro. Os domínios de ligação ao DNA estão em azul, as α -hélices envolvidas na formação do tetrâmero estão em verde. O restante da proteína (tons de vermelho) tem os sítios de ligação para a alolactose. Os domínios de ligação à alolactose estão ligados aos domínios de ligação ao DNA por meio de hélices ligadoras (em amarelo). [Fonte: PDB ID 2PE5, R. Dabner et al., *J. Mol. Biol.* 370:609, 2007.]

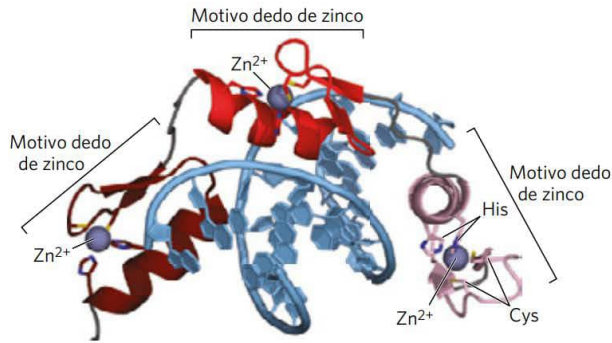


FIGURA 28-12 Dedos de zinco. Três dedos de zinco (tons de vermelho) da proteína regulatória Zif268 complexada com DNA (em azul). Cada Zn^{2+} está coordenado com dois resíduos de His e com dois resíduos de Cys. [Fonte: PDB ID 1ZAA, N. P. Pavletich e C. O. Pabo, *Science* 252:809, 1991.]

helicoidais é chamado de hélice de reconhecimento, pois geralmente contém muitos dos aminoácidos que interagem com o DNA de uma maneira com sequência específica. Essa α -hélice é empilhada em outros segmentos da estrutura proteica, de modo a se projetar para fora da superfície da proteína. Quando ligada ao DNA, a hélice de reconhecimento é posicionada no sulco principal ou próxima a ele. O repressor Lac tem um motivo de ligação ao DNA (Figura 28-11).

Dedo de zinco Em um **dedo de zinco**, cerca de 30 resíduos de aminoácidos formam uma alça alongada unida na base por um único íon Zn^{2+} , coordenado a quatro resíduos (quatro Cys, ou dois resíduos de Cys e dois de His). Por si só, o zinco não interage com o DNA; em vez disso, a coordenação do zinco com os resíduos de aminoácidos estabiliza esse pequeno motivo estrutural. Várias cadeias laterais hidrofóbicas no núcleo da estrutura também contribuem para a estabilidade. A **Figura 28-12** mostra a interação entre o DNA e três dedos de zinco de um único polipeptídeo da proteína regulatória do camundongo Zif268.

Muitas proteínas de ligação ao DNA de eucariotos contêm dedos de zinco. Em geral, a interação de um único dedo de zinco com o DNA é fraca, e muitas proteínas de ligação ao DNA, como a Zif268, apresentam vários dedos de zinco que reforçam substancialmente a ligação por interagirem simultaneamente com o DNA. Uma proteína de ligação ao DNA da rã *Xenopus* tem 37 dedos de zinco. Há poucos exemplos conhecidos do motivo dedo de zinco em proteínas bacterianas.

O modo preciso pelo qual proteínas com dedos de zinco se ligam ao DNA difere de uma proteína para outra. Alguns dedos de zinco contêm resíduos de aminoácidos importantes na diferenciação de sequências, ao passo que outros parecem se ligar ao DNA de modo não específico (os aminoácidos necessários para a especificidade estão localizados em outra parte da proteína). Os dedos de zinco também funcionam como motivos de ligação ao RNA, como ocorre em determinadas proteínas que ligam mRNA de eucariotos e agem como repressores da tradução. Esse papel será discutido posteriormente (Seção 28.3).

Homeodomínio Outro tipo de domínio de ligação ao DNA foi identificado em algumas proteínas que agem como regula-

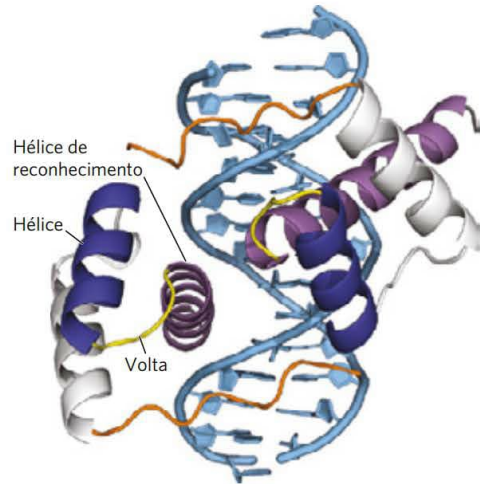


FIGURA 28-13 Homeodônios. Estão mostrados dois homeodônios ligados ao DNA. Em cada homeodomínio, uma das α -hélices (em roxo), acomodadas sobre duas outras (em azul-escuro e cinza), pode ser vista protraindo em direção ao sulco maior. Isso é apenas uma pequena parte de uma proteína regulatória maior de uma classe, chamada de Pax, que participa na regulação do desenvolvimento em moscas-da-fruta (ver Seção 28.3). [Fonte: PDB ID 1FJL, D. S. Wilson et al., *Cell* 82:709, 1995.]

dores de transcrição, sobretudo durante o desenvolvimento de eucariotos. Esse domínio de 60 resíduos de aminoácidos – chamado de **homeodomínio** porque foi descoberto em genes homeóticos (genes que regulam o desenvolvimento de padrões corporais) – é altamente conservado e agora foi identificado em proteínas de uma grande variedade de organismos, incluindo os seres humanos (**Figura 28-13**). O segmento de ligação ao DNA do domínio está relacionado ao motivo hélice-volta-hélice. A sequência de DNA que codifica esse domínio é conhecida como **homeobox**.

Motivo de reconhecimento de RNA Um domínio de ligação ao RNA não está fora dessa discussão. **Motivos de reconhecimento de RNA (RRM)** são encontrados em alguns ativadores de genes de eucariotos e podem ter dupla função, ligar DNA e ligar RNA. Quando ligados a sítios específicos no DNA, esses ativadores induzem a transcrição. Algumas vezes, esses mesmos ativadores são em parte regulados por lncRNA, que competem na ligação ao DNA, e, assim, a transcrição gênica é diminuída. Outras proteínas com motivos RRM se ligam a mRNA, rRNA ou a qualquer um dos vários outros RNA não codificantes pequenos. O motivo RRM é formado por 90 a 100 resíduos de aminoácidos, organizados em quatro fitas de folhas β antiparalelas no meio de duas α -hélices com topologia $\beta_1-\alpha_1-\beta_2-\beta_3-\alpha_2-\beta_4$ (**Figura 28-14**). Esse motivo pode estar presente como parte de uma proteína regulatória que liga DNA e que tem outros motivos para ligação ao DNA ou podem ocorrer em proteínas que se ligam apenas a RNA.

Proteínas regulatórias também têm domínios de interação proteína-proteína

Proteínas regulatórias contêm domínios não apenas para a ligação do DNA, mas também para interações proteína-proteína com a RNA-polimerase, com outras proteínas re-

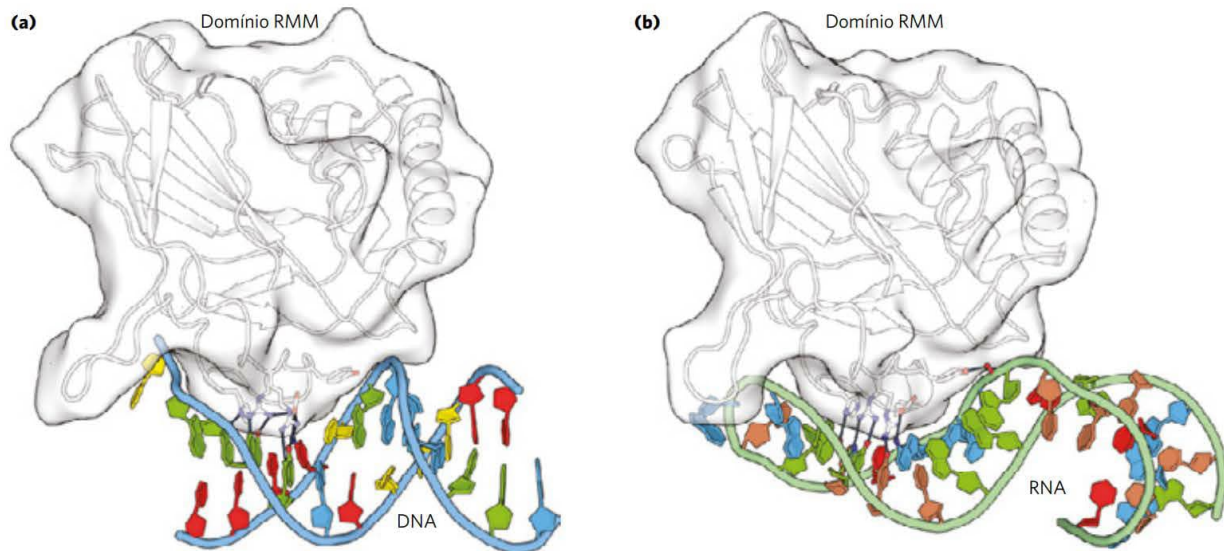


FIGURA 28-14 Motivos de reconhecimento de RNA (RRM). RRM da subunidade p50 da proteína regulatória NF- κ B ligado ao (a) DNA e ao (b) RNA. As interações por meio de ligações de hidrogênio entre resíduos de aminoácidos específicos e bases no DNA ou no RNA estão mostradas por linhas pretas. NF- κ B é o nome de uma família de fatores de transcrição de eucariotos estruturalmente relacionada e que regula processos que vão das respostas imune e inflamatória até o crescimento celular e a apoptose. [Fontes: (a) PDB ID 1OOA, D. B. Huang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:9268, 2003. (b) PDB ID 1VKX, F. E. Chen et al., *Nature* 391:410, 1998.]

regulatórias ou com outras subunidades da mesma proteína regulatória. Entre os exemplos, incluem-se muitos fatores de transcrição de eucariotos que funcionam como ativadores de genes, geralmente ligados como dímeros ao DNA por meio de domínios de ligação ao DNA que contêm dedos de zinco. Alguns domínios estruturais são dedicados às interações necessárias à formação de dímeros, geralmente um pré-requisito para a ligação do DNA. Assim como os motivos de ligação ao DNA, os motivos estruturais que controlam as interações proteína-proteína tendem a se enquadrar em algumas categorias comuns. Dois exemplos importantes são o zíper de leucina e o hélice-alça-hélice básico. Motivos estruturais como esses são a base para classificar algumas proteínas regulatórias em famílias estruturais.

Zíper de leucina O **zíper de leucina** é uma α -hélice anfipática com uma série de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos concentrados em um dos lados (**Figura 28-15**), sendo que superfície hidrofóbica forma a área de contato entre os dois polipeptídeos de um dímero. Uma característica marcante dessas α -hélices é a ocorrência de resíduos de Leu a cada sétima posição, formando uma linha reta ao longo da superfície hidrofóbica. Embora os cientistas inicialmente pensassem que os resíduos de leucina interdigitavam (daí o nome “zíper”), agora se sabe que eles se alinham lado a lado à medida que as α -hélices que interagem se enrolam uma em torno da outra (formando uma bobina espiralada; **Figura 28-15b**). Proteínas regulatórias com zíperes de leucina frequentemente têm um domínio separado de ligação ao DNA com alta concentração de resíduos básicos (Lys ou Arg) que podem interagir com os fosfatos carregados negativamente do esqueleto do DNA. Zíperes de leucina são encontrados em muitas proteínas de eucariotos e em algumas proteínas bacterianas.

Hélice-alça-hélice básico Outro motivo estrutural muito comum, o **hélice-alça-hélice básico**, ocorre em algumas proteínas regulatórias de eucariotos envolvidos no controle da expressão gênica durante o desenvolvimento de organismos multicelulares. Essas proteínas têm em comum uma região conservada de cerca de 50 resíduos de aminoácidos, a qual é importante tanto para a ligação ao DNA quanto na dimerização de proteínas. Essa região forma duas α -hélices anfipáticas ligadas por uma alça de comprimento variável, a hélice-alça-hélice (distinta do motivo hélice-volta-hélice associado à ligação do DNA). Os motivos hélice-alça-hélice de dois polipeptídeos interagem para formar dímeros (**Figura 28-16**). Nessas proteínas, a ligação ao DNA é mediada por uma sequência adjacente curta de aminoácidos rica em resíduos básicos, semelhante à região de ligação ao DNA, mas separada dela, que ocorre nas proteínas que contêm zíperes de leucina.

Interações proteína-proteína em proteínas regulatórias de eucariotos

Em eucariotos, a maioria dos genes é regulada por ativadores e a maioria dos genes é monocistrônica. Se um ativador diferente fosse necessário para cada gene, o número de ativadores (e de genes que os codificam) teria de ser equivalente ao número de genes regulados. Entretanto, em leveduras, cerca de 300 fatores de transcrição (muitos deles ativadores) são responsáveis pela regulação dos muitos milhares de genes de leveduras. Muitos dos fatores de transcrição regulam a indução de vários genes, mas a maioria dos genes está sujeita à regulação por vários fatores de transcrição (para exemplo, ver **Figura 15-25**). A regulação apropriada de genes diferentes é feita utilizando combinações diferentes de um repertório limitado de fatores de

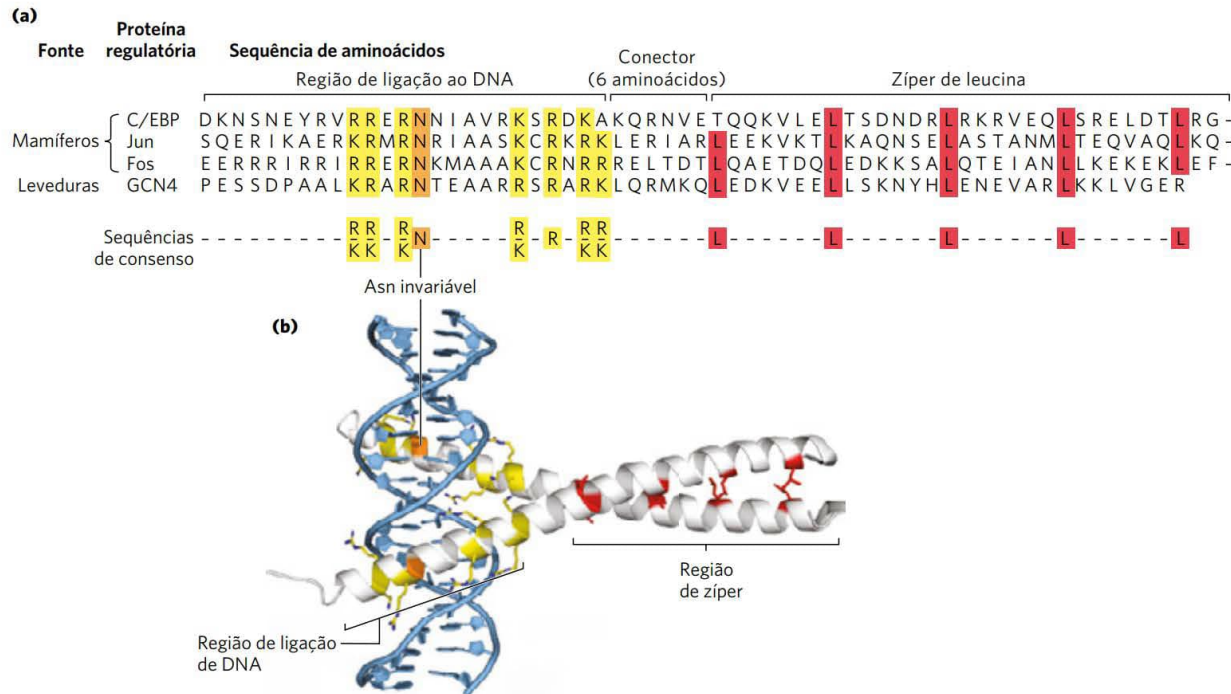


FIGURA 28-15 Zíperes de leucina. (a) Comparação de sequências de aminoácidos de várias proteínas zíper de leucina. Observe a presença de resíduos de Leu (L) (em vermelho) a cada sétima posição na região do zíper e o número de resíduos de Lys (K) e Arg (R) na região de ligação ao DNA (em amarelo). (b) Zíper de leucina da proteína ativadora GCN4 de levedura. Apenas as α -hélices “fechadas” (em cinza), derivadas de diferentes subunidades da proteína dimérica, estão mostradas. As duas hélices se enrolam uma ao redor da outra em uma espiral suave. As cadeias laterais de Leu e os resíduos conservados na região de ligação ao DNA estão coloridos para corresponderem à sequência mostrada em (a). [Fontes: (a) informações de S. L. McKnight, *Sci. Am.* 264 (abril):54, 1991. (b) PDB ID 1YSA, T. E. Ellenberger et al., *Cell* 71:1223, 1992.]

transcrição em cada gene, fenômeno chamado de **controle combinatório**.

O controle combinatório é atingido em parte misturando-se e combinando as variantes dentro de uma família de

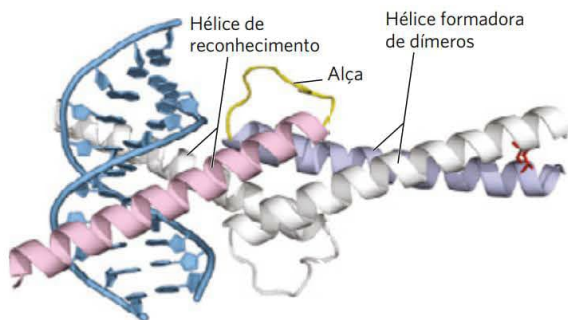


FIGURA 28-16 Hélice-alça-hélice. O fator de transcrição Max humano, ligado ao seu sítio-alvo no DNA. A proteína é dimérica; uma subunidade está colorida. A hélice de reconhecimento (em cor-de-rosa) é ligada pela alça à hélice formadora de dímeros (em azul-claro), que se funde à extremidade carboxiterminal da subunidade. A interação das hélices carboxiterminais das duas subunidades apresenta uma espiral muito semelhante àquela de um zíper de leucina (ver Figura 28-15b), mas, nesse exemplo, com apenas um par de resíduos de Leu que interagem (cadeias laterais vermelhas à direita). A estrutura geral é algumas vezes chamada de motivo hélice-alça-hélice/zíper de leucina. [Fonte: PDB ID 1HLO, P. Brownlie et al., *Structure* 5:509, 1997.]

proteínas regulatórias para formar uma série de dímeros proteicos ativos diferentes. Várias famílias de fatores de transcrição eucarióticos foram definidas com base no grau de semelhanças entre as estruturas. Dentro de cada família, os dímeros podem às vezes ser formados entre duas proteínas idênticas (homodímero) ou entre dois membros diferentes da família (heterodímero). Portanto, uma família hipotética de quatro proteínas zíper de leucina diferentes forma até 10 espécies diméricas diferentes. Em muitos casos, as diferentes combinações têm propriedades regulatórias e funcionais diferentes e regulam genes diferentes. Como será visto, várias proteínas regulatórias desse tipo funcionam na regulação da maioria dos genes de eucariotos, contribuindo adicionalmente para o controle combinatório.

Além de terem domínios estruturais dedicados à ligação com DNA e à dimerização da proteína, direcionando, assim, determinado dímero de proteína para um gene específico, muitas proteínas regulatórias possuem domínios que interagem com RNA-polimerase, com RNA regulatórios, com outras proteínas regulatórias ou com alguma combinação entre os três. Pelo menos três tipos de domínios adicionais para a interação proteína-proteína foram caracterizados (principalmente em eucariotos): domínios ricos em glutamina, domínios ricos em prolina e domínios ácidos; esses nomes refletem os resíduos de aminoácidos especialmente abundantes nesses domínios.

As interações proteína-DNA e proteína-RNA são as bases para circuitos regulatórios intrincados que são fundamentais para a função gênica. Esses esquemas regulatórios serão agora examinados detalhadamente, primeiro em bactérias e depois em eucariotos.

RESUMO 28.1 Princípios da regulação gênica

- A expressão dos genes é regulada por processos que afetam as taxas com que os produtos gênicos são sintetizados e degradados. A maior parte dessa regulação ocorre no nível da iniciação da transcrição, mediada por proteínas regulatórias que, atuando em promotores específicos, reprimem a transcrição (regulação negativa) ou a ativam (regulação positiva).
- Em bactérias, os genes que codificam produtos com funções interdependentes são frequentemente agrupados em um operon, unidade única de transcrição. A transcrição dos genes geralmente é bloqueada pela ligação de uma proteína repressora específica em um sítio de DNA chamado de operador. A dissociação do repressor do operador é mediada por uma molécula específica pequena, um indutor. Esses princípios foram primeiro elucidados em estudos do operon da lactose (*lac*). O repressor Lac se dissocia do operador *lac* quando o repressor se liga ao seu indutor, a alolactose.
- As proteínas regulatórias são proteínas que se ligam ao DNA e que reconhecem sequências de DNA específicas; a maioria tem domínios distintos de ligação ao DNA. Entre esses domínios, motivos estruturais comuns que ligam DNA (e/ou RNA) são hélice-volta-hélice, dedo de zinco, homeodomínios e motivos de reconhecimento de RNA.
- As proteínas regulatórias também contêm domínios para interações proteína-proteína, incluindo o zíper de leucina e a hélice-alça-hélice, que estão envolvidos na dimerização, e outros motivos necessários para a ativação da transcrição. Misturar e combinar variantes de famílias de proteínas em fatores de transcrição diméricos fornece uma regulação da resposta mais eficiente por meio do controle combinatório.

28.2 Regulação da expressão gênica em bactérias

Como em muitas outras áreas de investigação bioquímica, o estudo da regulação da expressão gênica avançou mais cedo e mais rapidamente em bactérias do que em outros organismos experimentais. Os exemplos de regulação gênica em bactérias aqui apresentados foram escolhidos considerando-se os sistemas bem estudados, parcialmente devido ao significado histórico, mas principalmente porque fornecem uma boa visão geral da amplitude dos mecanismos regulatórios em bactérias. Muitos dos princípios da regulação gênica bacteriana também são relevantes para compreender a expressão gênica em células eucarióticas.

Primeiro, serão examinados os operons da lactose e do triptofano; cada sistema possui proteínas regulatórias, po-

rém os mecanismos gerais de regulação são muito diferentes. Depois, será feita uma pequena discussão da resposta SOS em *E. coli*, ilustrando como os genes espalhados por todo o genoma podem ser regulados coordenadamente. Então, serão descritos dois sistemas bacterianos de tipos muito diferentes, a fim de ilustrar a diversidade dos mecanismos regulatórios dos genes: a regulação da síntese proteica ribossômica no nível da tradução, com muitas das proteínas regulatórias se ligando ao RNA (em vez de ao DNA) e a regulação do processo de “variação de fase” em *Salmonella*, o qual resulta da recombinação gênica. Finalmente, serão examinados mais alguns exemplos de regulação pós-transcricional em que o RNA modula sua própria função.

O operon *lac* sofre regulação positiva

As interações entre operador-repressor-indutor descritas anteriormente para o operador *lac* (Figura 28-8) fornecem um modelo suficientemente intuitivo para o liga/desliga que ocorre na regulação da expressão gênica, embora a regulação do operon raramente seja tão simples assim. O ambiente de uma bactéria é complexo demais para que seus genes sejam controlados por apenas um sinal. Outros fatores além da lactose afetam a expressão dos genes *lac*, como, por exemplo, a disponibilidade de glicose. A glicose, metabolizada diretamente pela glicólise, é a fonte de energia preferida em *E. coli*. Outros açúcares podem servir como o único nutriente principal, mas etapas enzimáticas extras são necessárias para prepará-los para entrar na glicólise, precisando da síntese de enzimas adicionais. Claramente, expressar os genes que codificam para proteínas que metabolizam açúcares como lactose ou arabinose é um desperdício quando a disponibilidade de glicose for abundante.

O que acontece com a expressão do operon *lac* quando tanto glicose como lactose estão presentes? Um mecanismo regulatório conhecido como **repressão de catabólitos** restringe a expressão dos genes necessários para o catabolismo de lactose, arabinose e outros açúcares na presença de glicose, mesmo quando esses açúcares secundários também estão presentes. O efeito da glicose é mediado pelo cAMP, como coativador, e uma proteína ativadora conhecida como **proteína receptora de cAMP**, ou **CRP** (a proteína às vezes é chamada de CAP; i.e., proteína ativadora de genes para catabólitos). A CRP é um homodímero (subunidade M_r 22.000) com sítios de ligação para o DNA e o cAMP. A ligação é mediada por um motivo hélice-volta-hélice no domínio de ligação ao DNA presente na proteína (**Figura 28-17**). Quando a glicose está ausente, a CRP-cAMP liga-se a um sítio próximo do promotor *lac* (**Figura 28-18**) e estimula a transcrição de RNA em 50 vezes. A CRP-cAMP é, portanto, um elemento regulatório positivo que responde aos níveis de glicose, ao passo que o repressor Lac é um elemento regulatório negativo que responde à lactose. Os dois atuam em conjunto. A CRP-cAMP tem pouco efeito no operon *lac* quando o repressor Lac está bloqueando a transcrição, e a dissociação do repressor do operador *lac* tem pouco efeito na transcrição do operon *lac*, a menos que o CRP-cAMP esteja presente para facilitar a transcrição; quando a CRP não está ligada ao DNA, o promotor do *lac* do tipo selvagem é um promotor relativamente fraco (Fi-

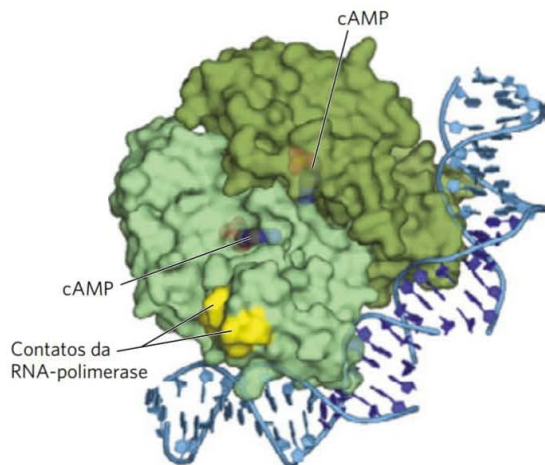


FIGURA 28-17 Homodímero CRP com cAMP ligado. Observe a torção do DNA ao redor da proteína. A região que interage com a RNA-polimerase está indicada em amarelo. [Fonte: PDB ID 1RUN, G. Parkinson et al., *Nature Struct. Biol.* 3:837, 1996.]

gura 28-18a, c). O complexo aberto de RNA-polimerase e promotor (ver Figura 26-6) não se forma prontamente, a menos que a CRP-cAMP esteja presente. A CRP interage diretamente com a RNA-polimerase (na região mostrada na Figura 28-17) através da subunidade α da polimerase.

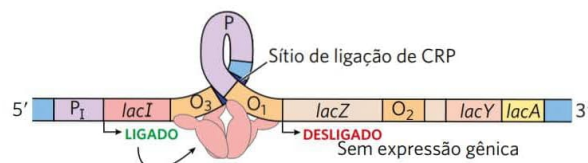
O efeito da glicose na CRP é mediado pela interação com a cAMP (Figura 28-18). A CRP se liga ao DNA mais avidamente quando as concentrações de cAMP estão altas. Na presença de glicose, a síntese de cAMP é inibida e o efluxo de cAMP da célula é estimulado. À medida que a [cAMP] diminui, a ligação da CRP ao DNA diminui e, assim, a expressão do operon *lac* é reduzida. Portanto, uma indução forte do operon *lac* necessita tanto de lactose (para inativar o repressor *lac*) quanto de baixa concentração de glicose (para disparar um aumento na cAMP e, assim, aumentar a ligação de cAMP à CRP).

A CRP e a cAMP estão envolvidas na regulação coordenada de muitos operons, principalmente daqueles que codificam enzimas para o metabolismo de açúcares secundários, como a lactose e arabinose. Uma rede de operons com um regulador comum é chamada de **regulon**. Esse arranjo, que permite mudanças coordenadas em funções celulares que precisam da ação de centenas de genes, é um tema central na expressão regulada de redes dispersas de genes em eucariotos. Outros regulons bacterianos incluem o sistema de genes de choque térmico que responde a mudanças de temperatura (p. 1039) e os genes induzidos em *E. coli* como parte do sistema de resposta SOS ao dano do DNA, descrito mais adiante.

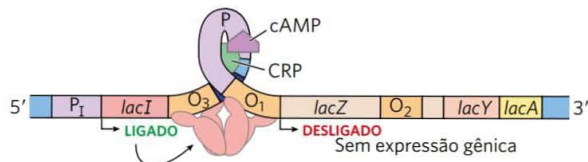
Muitos genes que codificam as enzimas da biossíntese de aminoácidos são regulados por atenuação da transcrição

Os 20 aminoácidos mais comuns são necessários em grandes quantidades para a síntese proteica, e a *E. coli* pode sintetizar todos eles. Os genes para as enzimas necessárias para sintetizar um determinado aminoácido estão geralmen-

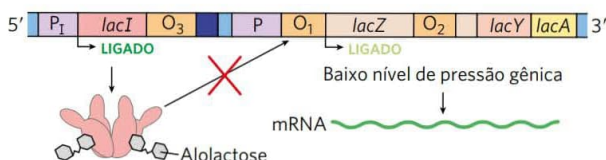
(a) Glicose alta, cAMP baixo, lactose ausente



(b) Glicose baixa, cAMP alto, lactose ausente



(c) Glicose alta, cAMP baixo, lactose presente



(d) Glicose baixa, cAMP alto, lactose presente

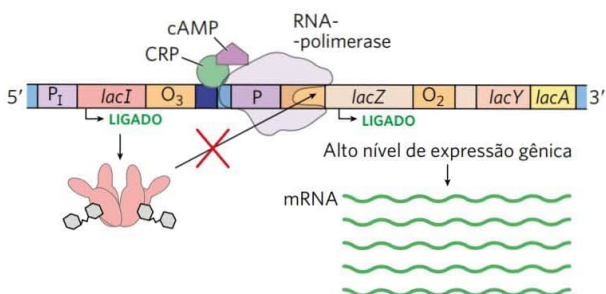


FIGURA 28-18 Regulação positiva do operon *lac* por CRP. O sítio de ligação para a CRP-cAMP está perto do promotor. Estão mostrados os efeitos combinados da disponibilidade de glicose e de lactose na expressão do operon *lac*. Quando a lactose está ausente, o repressor se liga ao operador e impede a transcrição dos genes *lac*. Não importa se a glicose está (a) presente ou (b) ausente. (c) Se a lactose estiver presente, o repressor se dissocia do operador. Entretanto, se a glicose estiver também disponível, níveis baixos de cAMP previnem a formação de CRP-cAMP e a ligação com o DNA. A RNA-polimerase pode ocasionalmente se ligar e iniciar a transcrição, resultando em um nível muito baixo de transcrição dos genes *lac*. (d) Quando a lactose estiver presente e os níveis de glicose estiverem baixos haverá aumento nos níveis de cAMP. O complexo CRP-cAMP se forma e facilita uma ligação robusta entre a RNA-polimerase e o promotor *lac*, e os níveis de transcrição são altos.

te agrupados em um operon e são expressos sempre que as reservas existentes desse determinado aminoácido sejam insuficientes para as necessidades celulares. Quando o aminoácido está em abundância, as enzimas de biossíntese não são necessárias, e o operon é reprimido.

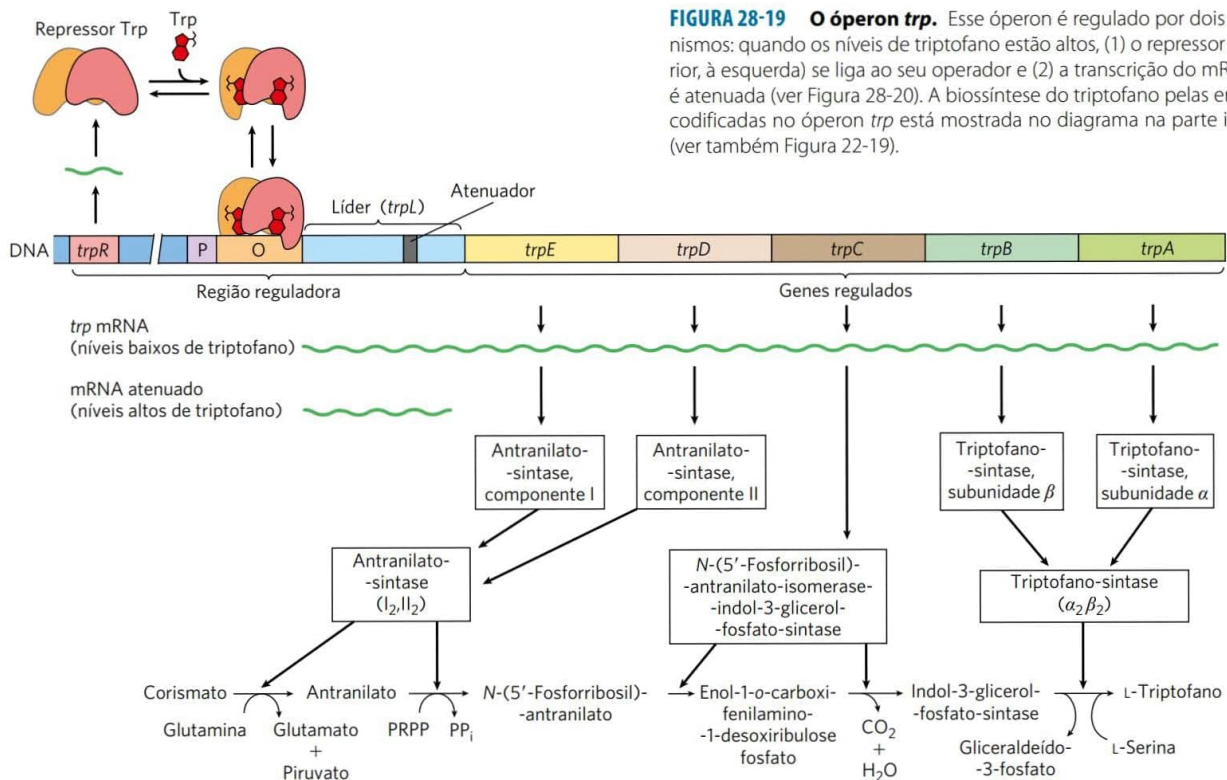


FIGURA 28-19 O operon *trp*. Esse operon é regulado por dois mecanismos: quando os níveis de triptofano estão altos, (1) o repressor (superior, à esquerda) se liga ao seu operador e (2) a transcrição do mRNA *trp* é atenuada (ver Figura 28-20). A biossíntese do triptofano pelas enzimas codificadas no operon *trp* está mostrada no diagrama na parte inferior (ver também Figura 22-19).

O operon do triptofano (*trp*) de *E. coli* (**Figura 28-19**) inclui cinco genes para as enzimas necessárias para converter corismato em triptofano. Observe que duas das enzimas catalisam mais de uma etapa da via. O mRNA do operon *trp* tem meia-vida de apenas cerca de 3 minutos, permitindo que a célula responda rapidamente às variações de necessidade desse aminoácido. O repressor Trp é um homodímero. Quando o triptofano for abundante, ele se liga ao repressor Trp, provocando uma mudança conformacional que permite ao repressor se ligar ao operador *trp* e inibir a expressão do operon *trp*. O sítio do operador *trp* se sobrepõe ao promotor, de modo que a ligação do repressor bloqueia a ligação da RNA-polimerase.

Uma vez mais, esse circuito liga/desliga simples mediado por um repressor não conta toda a história da regulação. Concentrações celulares diferentes de triptofano podem modificar a velocidade de síntese das enzimas da biossíntese desse aminoácido em até 700 vezes. Uma vez que a repressão seja suspensa e a transcrição se inicie, a velocidade de transcrição é ajustada às necessidades celulares de triptofano por um segundo processo regulatório, chamado de **atenuação da transcrição**, em que a transcrição é iniciada normalmente, mas é abruptamente interrompida *antes* que os genes do operon sejam transcritos. A frequência com que a transcrição é atenuada é regulada pela disponibilidade de triptofano e depende da associação muito estreita entre transcrição e tradução que há em bactérias.

O mecanismo de atenuação do operon *trp* emprega sinais codificados em quatro sequências no interior de uma **região-líder** de 162 nucleotídeos na extremidade 5' do

mRNA, antecedendo o códon de início do primeiro gene (**Figura 28-20a**). A sequência-líder contém uma região denominada **atenuador**, a qual é formada pelas sequências 3 e 4. Essas sequências pareiam para formar uma estrutura em grampo rica em G=C seguida de perto por uma série de resíduos de U. A estrutura do atenuador atua como terminador da transcrição (Figura 28-20b). A sequência 2 é um complemento alternativo para a sequência 3 (Figura 28-20c). Se as sequências 2 e 3 pareiam, a estrutura atenuadora não pode se formar, e a transcrição segue transcrevendo os genes da biossíntese de *trp*, pois o grampo formado pelas sequências pareadoras 2 e 3 não obstrui a transcrição.

A sequência regulatória 1 é crucial para um mecanismo sensível ao triptofano que determina se a sequência 3 pareia com a sequência 2 (permitindo que a transcrição continue) ou com a sequência 4 (atenuando a transcrição). A formação da estrutura atenuadora em grampo depende de eventos que ocorrem durante a *tradução* da sequência regulatória 1, que codifica um peptídeo-líder (assim chamado porque ele é codificado pela região-líder do mRNA) de 14 aminoácidos, dois dos quais são resíduos de Trp. O peptídeo-líder não tem nenhuma outra função celular conhecida; sua síntese é simplesmente um dispositivo regulatório do operon. Esse peptídeo é traduzido imediatamente depois que ele é transcrito, por um ribossomo que acompanha de perto a RNA-polimerase à medida que a transcrição prossegue.

Quando as concentrações de triptofano são altas, as concentrações de tRNA carregando triptofano (Trp-tRNA^{Trp})

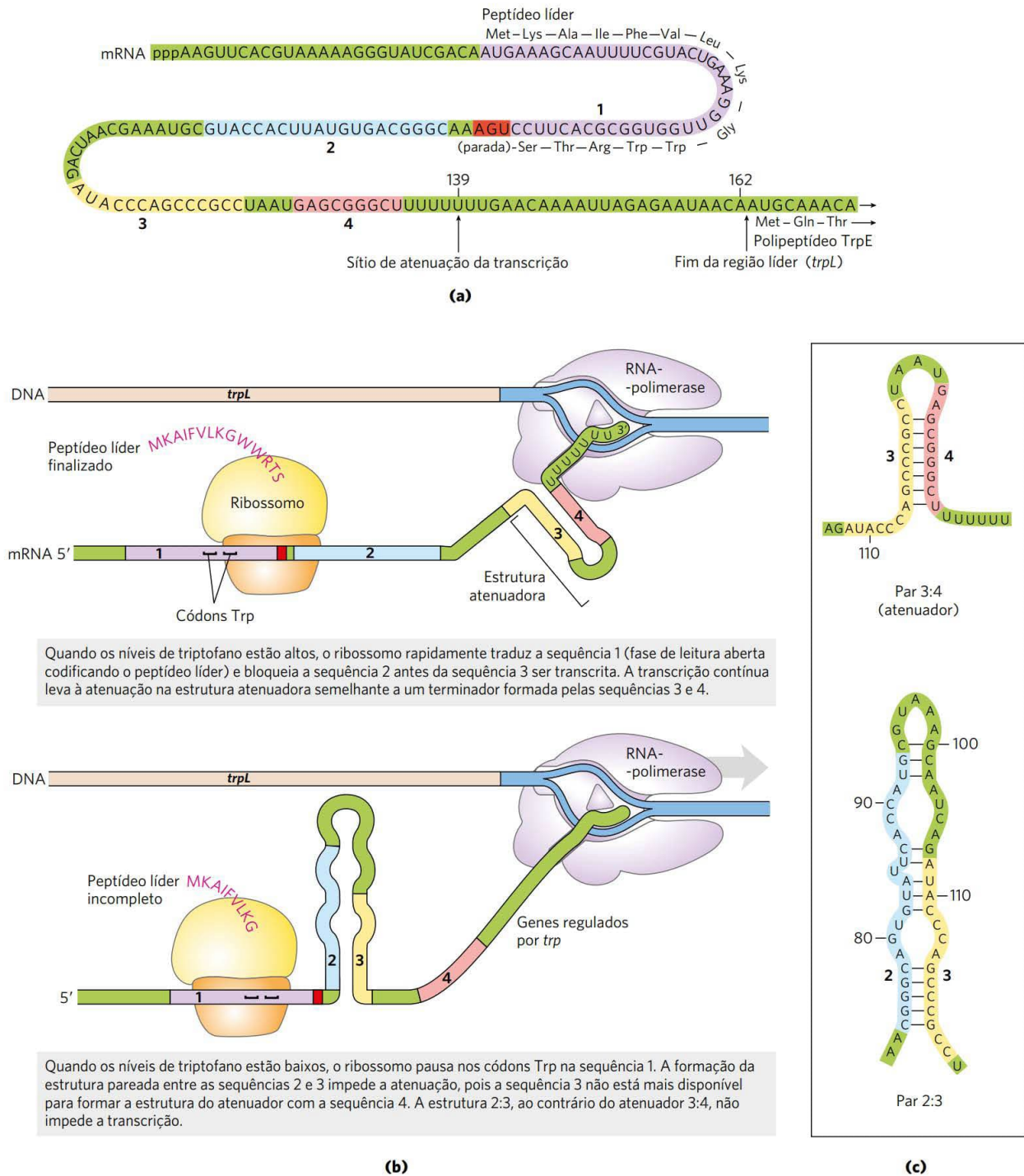


FIGURA 28-20 Atenuação da transcrição no operon *trp*. A transcrição é iniciada no começo do mRNA-líder de 162 nucleotídeos codificado na região do DNA denominada *trpL* (ver Figura 28-19). Um mecanismo regulatório determina se a transcrição é atenuada no final do líder ou continua para os genes estruturais. **(a)** O mRNA-líder do *trp* (*trpL*). O mecanismo de atenuação do operon *trp* envolve as sequências 1 a 4 (em destaque). **(b)** A sequência 1 codifica um pequeno peptídeo, o peptídeo-líder, contendo dois resíduos Trp (W); esse peptídeo é traduzido imediatamente após o início da transcrição. As sequências 2 e 3 são complementares, bem como as sequências 3 e 4. A estrutura do atenuador se forma pelo pareamento das sequências 3 e 4 (parte superior). Sua estrutura e função são semelhantes àquelas de um terminador de transcrição (ver Figura 26-7a). O pareamento das sequências 2 e 3 (parte inferior) impede a formação da estrutura do atenuador. Observe que o peptídeo-líder não tem outra função na célula. A tradução da fase de leitura aberta do líder tem um papel puramente regulatório que determina quais sequências complementares (2 e 3 ou 3 e 4) serão pareadas. **(c)** Esquemas de pareamento de bases para as regiões complementares do mRNA-líder do *trp*.

também são altas. Isso permite que a tradução prossiga rapidamente e ultrapasse os dois códons Trp da sequência 1 e passe para a sequência 2 antes de a sequência 3 ser sintetizada pela RNA-polimerase. Nessa situação, a sequência 2 é coberta pelo ribossomo e fica indisponível para pareamento com a sequência 3 quando esta é sintetizada. A estrutura atenuadora (sequência 3 e 4) se forma, e a transcrição é interrompida (Figura 28-20b, parte superior). Quando as concentrações de triptofano são baixas, no entanto, o ribossomo para nos dois códons Trp presentes na sequência 1, pois há menos disponibilidade de tRNA^{Trp} carregado com Trp. A sequência 2 permanece livre, ao passo que a sequência 3 é sintetizada, permitindo que essas duas sequências pareiem e que a transcrição prossiga (Figura 28-20b, parte inferior). Desse modo, a proporção de transcritos que é atenuada diminui à medida que a concentração de triptofano diminui.

Muitos outros operons da biossíntese de aminoácidos usam uma estratégia de atenuação semelhante para ajustar as enzimas da via de biossíntese para atender às necessidades celulares. O peptídeo-líder de 15 aminoácidos produzido pelo operon *phe* contém sete resíduos Phe. O peptídeo-líder do operon *leu* tem quatro resíduos contíguos Leu. O peptídeo-líder para o operon *his* contém sete resíduos contíguos His. De modo efetivo, no caso do operon *his* e de vários outros, a atenuação é suficientemente sensível para ser o único mecanismo regulatório.

A indução da resposta SOS requer a destruição das proteínas repressoras

Dano extenso no DNA do cromossomo bacteriano dispara a indução de muitos genes bem distantes. Essa resposta,

chamada de resposta SOS (p. 1013), fornece outro bom exemplo de regulação gênica coordenada. Muitos dos genes induzidos estão envolvidos no reparo do DNA (ver Tabela 25-6). As proteínas regulatórias-chave são a proteína RecA e o repressor LexA.

O repressor LexA (M_r 22.700) inibe a transcrição de todos os genes SOS (Figura 28-21), e a indução da resposta SOS requer a remoção de LexA. Isso não é uma simples dissociação do DNA em resposta à ligação de uma pequena molécula, como na regulação do operon *lac* descrita acima. Em vez disso, o repressor LexA é inativado quando ele catalisa sua própria clivagem em uma ligação peptídica específica Ala-Gly, produzindo dois fragmentos proteicos aproximadamente iguais. Em pH fisiológico, essa reação de autoclivagem requer a proteína RecA. Ela não é uma protease no sentido clássico, mas sua interação com LexA facilita a reação de autoclivagem do repressor. Essa função da RecA é, às vezes, chamada de atividade de coprotease.

A protease RecA faz a ligação funcional entre o sinal biológico (dano do DNA) e a indução dos genes SOS. Danos intensos no DNA levam a numerosas lacunas em uma das fitas do DNA, e apenas a RecA que está ligada ao DNA de fita simples pode facilitar a clivagem do repressor de LexA (Figura 28-21, parte inferior). A ligação de RecA com as lacunas eventualmente ativa a sua atividade de coprotease, levando à clivagem do repressor de LexA e à indução SOS.

Durante a indução da resposta SOS em uma célula danificada gravemente, a RecA também quebra e, portanto, inativa os repressores, que, caso contrário, permitiriam a propagação de certos vírus em um estado lisogênico dormente dentro do hospedeiro bacteriano. Isso provê uma demonstração excepcional da adaptação evolutiva. Esses

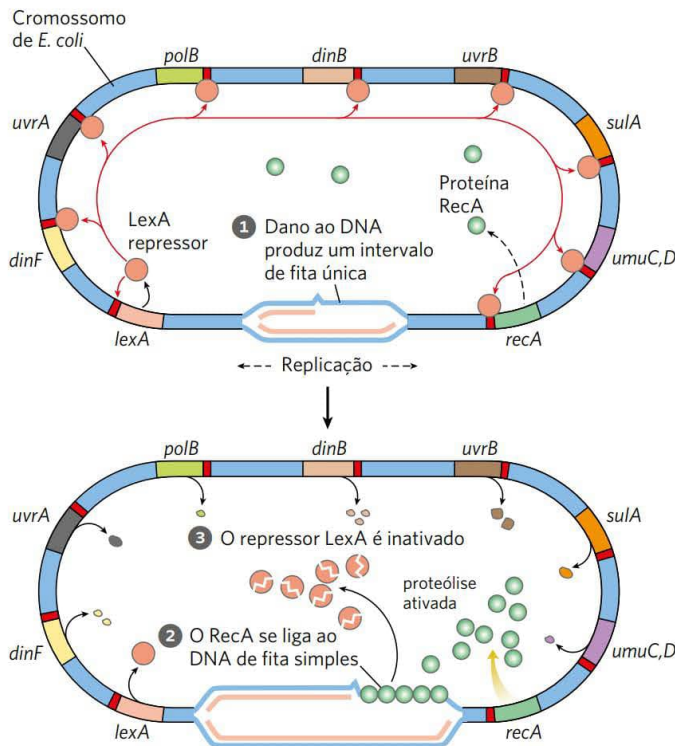


FIGURA 28-21 Resposta SOS em *E. coli*. Ver na Tabela 25-6 as funções de muitas destas proteínas. A proteína LexA é o repressor nesse sistema, que tem um sítio operador (em vermelho) perto de cada gene. Como o gene *recA* não é inteiramente reprimido pelo repressor LexA, uma célula normal contém cerca de 1.000 monômeros de RecA. 1 Quando o DNA é danificado extensivamente (como pela luz UV), a replicação do DNA é suspensa e aumenta o número de lacunas na fita simples do DNA. 2 A proteína RecA se liga a esse DNA danificado de fita simples, ativando a atividade de coprotease da proteína. 3 Enquanto está ligada ao DNA, a proteína RecA facilita a quebra e a inativação do repressor LexA. Quando o repressor é inativado, os genes SOS, inclusive *recA*, são induzidos; os níveis de RecA aumentam 50 a 100 vezes.

repressores, como o LexA, também sofrem autoclivagem em uma ligação peptídica específica Ala-Gly, de modo que a indução da resposta SOS permite a replicação do vírus e a lise da célula, liberando novas partículas de vírus. Portanto, o bacteriófago pode fazer uma saída rápida de uma célula bacteriana hospedeira comprometida.

A síntese de proteínas ribossômicas é coordenada com a síntese de rRNA

Em bactérias, o aumento da demanda por síntese proteica é satisfeito pelo aumento do número de ribossomos, em vez de alterações na atividade de ribossomos individuais. Em geral, o número de ribossomos aumenta à medida que a velocidade de crescimento celular aumenta. Em velocidades de crescimento mais altas, os ribossomos representam 45% do peso seco da célula. A proporção dos recursos celulares destinados a fabricar os ribossomos é tão grande, e a função dos ribossomos tão importante, que as células devem coordenar a síntese dos componentes ribossômicos: as proteínas ribossômicas (r-proteínas) e os RNA (rRNA). Essa regulação é distinta dos mecanismos descritos até agora, uma vez que ela ocorre em grande parte no nível da *tradução*.

Os 52 genes que codificam as r-proteínas estão distribuídos por pelo menos 20 óperons, cada um com 1 a 11 genes. Alguns desses óperons também contêm os genes que codificam as subunidades da DNA-primase, da RNA-polimerase e de fatores de alongamento da síntese proteica, revelando o íntimo acoplamento entre replicação, transcrição e síntese proteica durante o crescimento da célula bacteriana.

Os óperons de r-proteínas são regulados principalmente por um mecanismo de retroalimentação da tradução. Uma r-proteína codificada por cada óperon também funciona como um **repressor de tradução**, que se liga ao mRNA transcrito daquele óperon e bloqueia a tradução de todos os genes que o mensageiro codifica (**Figura 28-22**). Em geral, a r-proteína que desempenha o papel de repressora também se liga diretamente a um rRNA. Cada r-proteína repressora da tradução se liga com maior afinidade ao rRNA apropriado do que ao seu mRNA, de modo que o mRNA é ligado e a tradução reprimida apenas quando o nível da r-proteína excede aquele do rRNA. Isso garante que a tradução dos mRNA que codificam as r-proteínas seja reprimida apenas quando a síntese dessas r-proteínas excede aquela necessária para fazer ribossomos funcionais. Desse modo, a velocidade da síntese das r-proteínas é mantida em equilíbrio com a disponibilidade de rRNA.

O sítio de ligação do mRNA para o repressor da tradução está próximo do sítio de iniciação da tradução de um dos genes no óperon, geralmente o primeiro gene (**Figura 28-22**). Em outros óperons isso afetaria apenas aquele gene, uma vez que, nos mRNA policistrônicos bacterianos, a maioria dos genes tem sinais de tradução independentes. Nos óperons das r-proteínas, no entanto, a tradução de um gene depende da tradução de todos os outros. O mecanismo desse acoplamento da tradução ainda não é conhecido em detalhes. Entretanto, em alguns casos, a tradução de genes múltiplos parece ser bloqueada pela organização do mRNA em uma estrutura tridimensional que é estabilizada tanto pelo pareamento de bases internos quanto pela ligação a uma proteína repressora da tradução. Quando o repressor

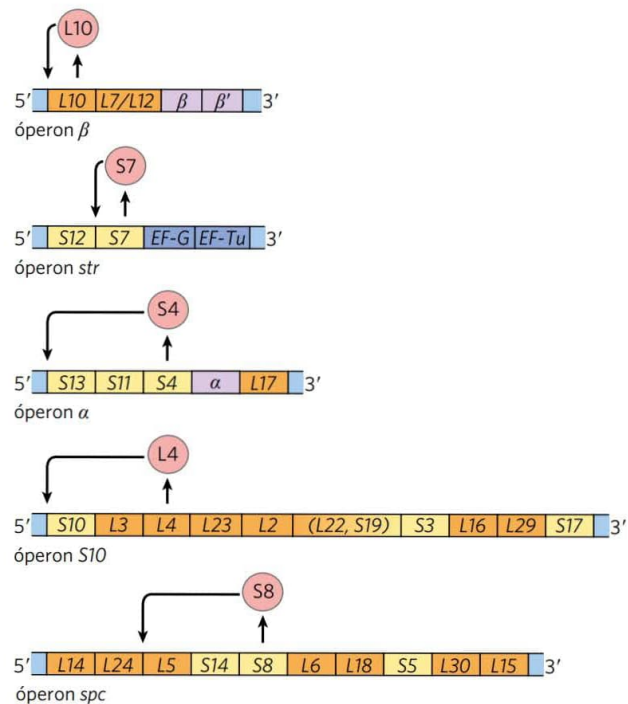
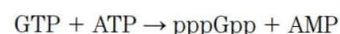


FIGURA 28-22 Retroalimentação da tradução em alguns óperons de proteínas ribossômicas. As r-proteínas que atuam como repressores de tradução estão mostradas em cor salmão. Cada repressor de tradução bloqueia a tradução de todos os genes naquele óperon ao se ligar ao sítio indicador no mRNA. Os genes que codificam as subunidades da RNA-polimerase estão mostrados em roxo; os genes que codificam os fatores de alongamento estão em azul. As r-proteínas da subunidade ribossômica maior (50S) são designadas L1 a L34; aquelas da subunidade menor (30S), S1 a S21.

da tradução está ausente, a ligação de ribossomos e a tradução de um ou mais genes desfaz a estrutura enovelada do mRNA, permitindo que todos os genes sejam traduzidos.

Uma vez que a síntese de r-proteínas é coordenada pela disponibilidade de rRNA, a regulação da produção do ribossomo reflete a regulação da síntese de rRNA. Em *E. coli*, a síntese de rRNA a partir de sete óperons de rRNA responde à velocidade de crescimento celular e a alterações na disponibilidade de nutrientes cruciais, particularmente aminoácidos. A regulação coordenada pelas concentrações de aminoácidos é conhecida como **resposta estrigente** (**Figura 28-23**). Quando as concentrações de aminoácidos são baixas, a síntese de rRNA é interrompida. A falta de aminoácidos leva à ligação de tRNA não carregados com aminoácidos ao sítio ribossômico A; isso dispara uma sequência de eventos que se inicia com a ligação de uma enzima, chamada de **fator estrigente** (proteína RelA) ao ribossomo. Quando ligado ao ribossomo, o fator estrigente catalisa a formação de um nucleotídeo incomum, a guanosina tetrafosfato (ppGpp), adicionando pirofosfato na posição 3' do GTP, na reação



e, a seguir, uma fosfo-hidrolase cliva um dos fosfatos, convertendo um pouco do pppGpp em ppGpp. O aumento

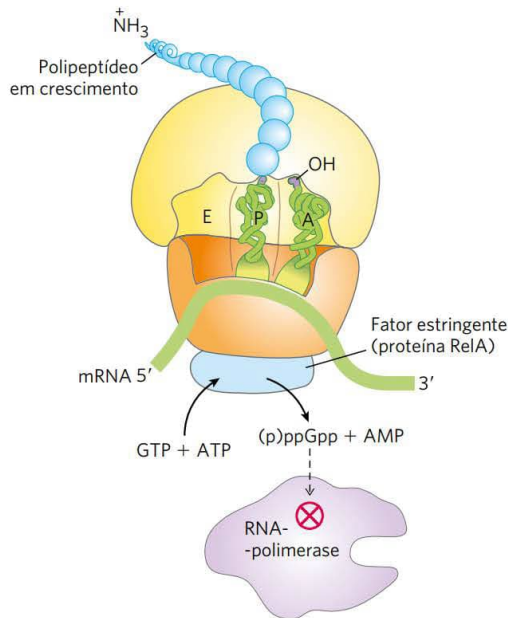


FIGURA 28-23 Resposta estrigente em *E. coli*. Essa resposta à privação de aminoácidos é disparada pela ligação de um tRNA não carregado com um aminoácido ao sítio A do ribossomo. Uma proteína chamada fator estrigente se liga ao ribossomo e catalisa a síntese de ppGpp, que é convertida por uma fosfo-hidrolase a pppGpp. O sinalizador pppGpp reduz a transcrição de alguns genes e aumenta a transcrição de outros, em parte por se ligar à subunidade β da RNA-polimerase e alterar a especificidade do promotor da enzima. A síntese de rRNA é reduzida quando os níveis de ppGpp aumentam.

abrupto nos níveis de ppGpp em resposta à falta de aminoácidos resulta em uma grande redução na síntese de rRNA, mediada, pelo menos em parte, pela ligação de ppGpp à RNA-polimerase.

Os nucleotídeos pppGpp e ppGpp, juntamente com cAMP, pertencem a uma classe de nucleotídeos modificados que agem como segundos mensageiros nas células. Em *E. coli*, esses dois nucleotídeos servem como sinais de fome; eles provocam grandes alterações no metabolismo celular, aumentando ou diminuindo a transcrição de centenas de genes. Em células eucarióticas, segundos mensageiros nucleotídicos semelhantes têm também funções regulatórias múltiplas. A coordenação do metabolismo celular com o crescimento da célula é altamente complexa, e mecanismos regulatórios adicionais, sem dúvida, ainda não foram descobertos.

O funcionamento de alguns mRNA é regulado por RNA pequenos em *cis* ou em *trans*

Como descrito ao longo deste capítulo, as proteínas desempenham um papel importante e bem-documentado na regulação da expressão gênica. O RNA, porém, também tem um papel crucial – papel este que está sendo cada vez mais reconhecido com as descobertas de novos exemplos de RNA regulatórios. Uma vez que um mRNA é sintetizado, as suas funções podem ser controladas por proteínas de ligação ao DNA, como visto para os óperons de r-proteínas recém-

-descritos, ou por um RNA. Uma molécula de RNA isolada pode se ligar ao mRNA “em *trans*” e afetar sua atividade. De modo alternativo, uma porção do próprio mRNA pode regular seu próprio funcionamento. Quando parte de uma molécula afeta o funcionamento de outra parte da mesma molécula, diz-se que ela atua “em *cis*”.

Um exemplo bem-caracterizado de regulação por RNA em *trans* é a regulação do gene *rpoS* (fator sigma da RNA-polimerase), que codifica σ^{38} , um dos sete fatores sigma de *E. coli* (ver Tabela 26-1). A célula usa esse fator de especificidade em certas situações de estresse, como quando entra em fase estacionária (estado de ausência de crescimento, necessário devido à ausência de nutrientes) e σ^{38} é necessário para transcrever vários genes de resposta ao estresse. O mRNA σ^{38} está presente em níveis baixos na maioria das condições, mas não é traduzido, uma vez que uma grande estrutura em grampo anterior à região codificadora inibe a ligação ao ribossomo (**Figura 28-24**). Sob certas condições de estresse, um ou ambos RNA pequenos

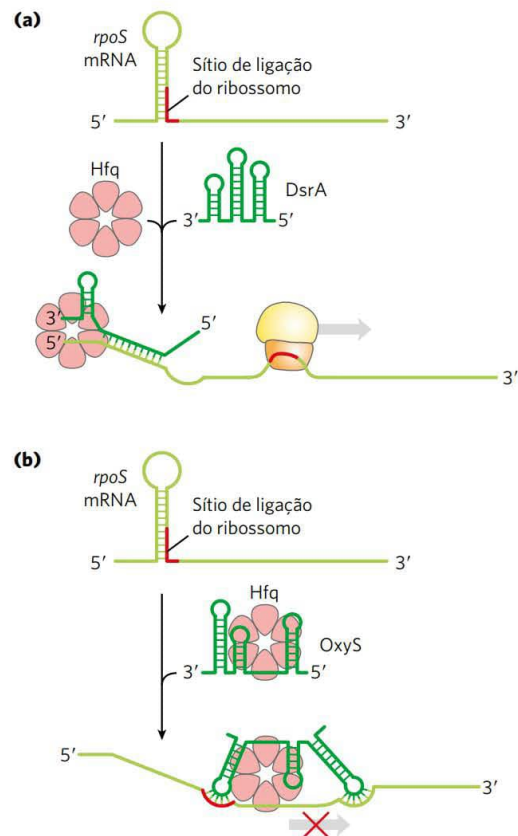


FIGURA 28-24 Regulação do funcionamento do mRNA bacteriano em *trans* pelos sRNA. Vários sRNA (RNA pequenos) – DsrA, RprA e OxyS – participam na regulação do gene *rpoS*. Todos precisam da proteína Hfq, uma chaperona de RNA que facilita o pareamento RNA-RNA. A Hfq tem uma estrutura tireoide, com um poro no centro. (a) A DsrA promove a tradução ao parear com uma fita de uma estrutura em grampo que, de outra forma, bloquearia o sítio de ligação ao ribossomo. A RprA (não mostrada) atua de modo semelhante. (b) A OxyS bloqueia a tradução ao parear com o sítio de ligação ao ribossomo. [Fonte: informações de M. Szymański e J. Barciszewski, *Genome Biol.* 3:reviews0005.1, 2002.]

de função especial são induzidos, DsrA (a jusante da região A) e RprA (regulador Rpos do RNA A). Ambos podem parear com uma fita do grampo no mRNA de σ^S , desfazendo o grampo e, assim, permitindo a tradução do gene *rpoS*. Outro pequeno RNA, OxyS (gene S de estresse oxidativo), é induzido sob condições de estresse oxidativo e inibe a tradução do *rpoS*, provavelmente ao parear com e bloquear o sítio de ligação de ribossomos no mRNA. O OxyS é expresso como parte de um sistema que responde a um tipo diferente de estresse (dano oxidativo) do que o *rpoS* e tem o papel de impedir a expressão de vias de reparo desnecessárias. DsrA, RprA e OxyS são moléculas de RNA bacteriano relativamente pequenas (menos de 300 nucleotídeos), designadas sRNA (*s* de *small* [pequenos]; existem, é claro, outros RNA “pequenos” com outras designações em eucariotos). Para funcionarem, todos precisam de uma proteína chamada Hfq, uma chaperona de RNA que facilita o pareamento RNA-RNA. Em uma espécie bacteriana típica são poucos os genes que são regulados dessa maneira, apenas poucas dúzias. No entanto, esses exemplos dão bons sistemas-modelo para compreender os padrões presentes nos exemplos mais complexos e numerosos de regulação mediada por RNA em eucariotos.

A regulação em *cis* envolve uma classe de estruturas de RNA conhecidas como **ribocomutadores**. Como descrito no Quadro 26-3, aptâmeros são moléculas de RNA, geradas *in vitro*, capazes de ligação específica a um tipo particular de ligante. Como se pode esperar, os domínios de RNA que ligam ligantes também estão presentes na natureza – em ribocomutadores – em um número significativo de mRNA bacterianos (e mesmo em alguns mRNA eucaróticos). Estes aptâmeros naturais são domínios estruturados encontrados em regiões não traduzidas nas extremidades 5' de certos mRNA bacterianos. Alguns ribocomutadores também regulam a transcrição de certos RNA não codificantes. A ligação do ribocomutador de mRNA ao seu ligante apropriado produz uma mudança conformacional no mRNA, e a transcrição é inibida pela estabilização de uma estrutura prematura de terminação da transcrição, ou a tradução é inibida (em *cis*) pela oclusão do sítio de ligação de ribossomos (**Figura 28-25**). Na maioria dos casos, o ribocomutador atua em um tipo de alça de retroalimentação. A maioria dos genes regulados desse modo está envolvida na síntese ou no transporte do ligante que é ligado pelo ribocomutador; assim, quando o ligante está presente em altas concentrações, o ribocomutador inibe a expressão dos genes necessários para reabastecer esse ligante.

Cada ribocomutador se liga a apenas um ligante. Foram detectados ribocomutadores diferentes que respondem a mais de uma dúzia de ligantes diferentes, incluindo tiamina-pirofosfato (TPP, vitamina B), cobalamina (vitamina B₁₂), mononucleotídeo de flavina, lisina, S-adenosilmetionina (adoMet), purinas, N-acetilglicosamina-6-fosfato, glicina e alguns cátions metálicos, como Mn²⁺. É provável que muitos outros ainda sejam descobertos. O ribocomutador que responde ao TPP parece ser o mais difundido; ele é encontrado em muitas bactérias, fungos e em algumas plantas. O ribocomutador do TPP bacteriano inibe a tradução em algumas espécies e induz a terminação prematura da transcrição em outras (Figura 28-25). O ribocomuta-

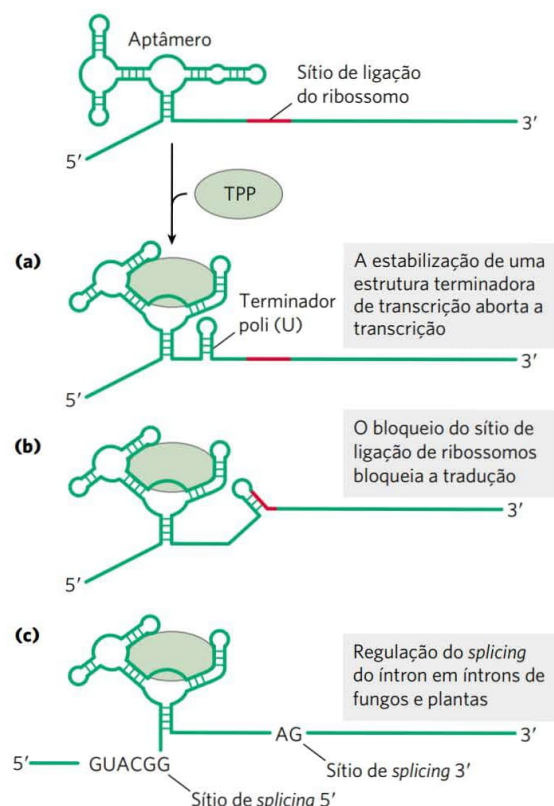


FIGURA 28-25 Regulação do funcionamento do mRNA bacteriano em *cis* por ribocomutadores. Os modos de ação conhecidos são ilustrados por vários ribocomutadores diferentes, com base em um aptâmero natural muito difundido que se liga à tiamina-pirofosfato. A ligação de TPP ao aptâmero leva a uma mudança conformacional que produz os resultados variáveis ilustrados nas partes (a), (b) e (c) nos diferentes sistemas em que o aptâmero é utilizado. [Fonte: informações de W. C. Winkler e R. R. Breaker, *Annu. Rev. Microbiol.* 59:487, 2005.]

dor de TPP eucariótico é encontrado nos introns de certos genes e modula o seu *splicing* alternativo (ver Figura 26-19b). Ainda não está claro o quanto os ribocomutadores são comuns. Todavia, estimativas sugerem que mais de 4% dos genes de *Bacillus subtilis* sejam regulados por ribocomutadores.

À medida que os ribocomutadores são mais bem entendidos, os cientistas estão encontrando aplicações médicas. Por exemplo, a maioria dos ribocomutadores descritos até o momento, incluindo aquele que responde à adoMet, foram encontrados apenas em bactérias. Um fármaco que se ligasse e ativasse o ribocomutador adoMet desligaria os genes que codificam enzimas que sintetizam e transportam adoMet, privando as células bacterianas desse cofator essencial. Fármacos desse tipo estão sendo prospectados para serem usados como uma nova classe de antibióticos. ■

O ritmo de descoberta de RNA funcionais não mostra sinais de diminuir e continua a reforçar a hipótese de que o RNA desempenhou um papel especial na evolução da vida (Capítulo 26). Os RNA e os ribocomutadores, como as ribozimas e os ribossomos, podem ser vestígios de um mundo de

RNA obscurecido pelo tempo, mas que persiste em um rico conjunto de dispositivos biológicos ainda em funcionamento na biosfera atual. A seleção, em laboratório, de aptâmeros e ribozimas com novas funções enzimáticas e de ligantes indica que as atividades baseadas em RNA necessárias para um mundo de RNA são possíveis. A descoberta de várias das mesmas funções do RNA em muitos organismos vivos mostra que, de fato, existem componentes essenciais do metabolismo que têm como base o RNA. Por exemplo, os aptâmeros naturais dos ribocomutadores podem ser derivados de RNA que, bilhões de anos atrás, ligaram-se aos cofatores necessários que possibilitam os processos enzimáticos necessários para o metabolismo de mundo do RNA.

Alguns genes são regulados por recombinação genética

Agora, será abordado outro modo de regulação gênica bacteriana, no nível de rearranjo-recombinação de DNA. A *Salmonella typhimurium*, que habita o intestino de mamíferos, move-se, girando o flagelo na sua superfície celular (**Figura 28-26**). As várias cópias da proteína flagelina (M_r 53.000) que compõem o flagelo são alvo de destaque dos sistemas imunes de mamíferos. Contudo, as células de *Salmonella* têm um mecanismo que evita a resposta imune: elas alternam entre duas proteínas flagelinas distintas (FljB e FliC) aproximadamente uma vez a cada mil gerações, usando um processo chamado de **variação de fase**.

A troca é realizada pela inversão periódica de um segmento de DNA contendo o promotor para um gene da flagelina. A inversão é uma reação de recombinação sítio-específica (ver Figura 25-38) mediada pela recombinase Hin em sequências específicas de 14 pb (sequências *hix*) em cada extremidade do segmento de DNA. Quando o segmento de DNA está em uma orientação, o gene para a flagelina FljB e o gene que codifica um repressor (FljA) são expressos



FIGURA 28-26 *Salmonella typhimurium*. Os apêndices que saem da superfície são flagelos. [Fonte: Eye of Science/Science Source.]

(**Figura 28-27a**); esse repressor desliga a expressão do gene que codifica a flagelina FliC. Quando o segmento de DNA é invertido (**Figura 28-26b**), os genes *fljA* e *fljB* não são mais transcritos, e o gene *fliC* é induzido à medida que o repressor começa a se esgotar. A recombinase Hin, codificada pelo gene *hin* no segmento de DNA que sofre inversão, é expressa quando o segmento de DNA está em qualquer orientação, de modo que a célula pode sempre alternar de um estado para outro.

Esse tipo de mecanismo regulatório tem a vantagem de ser absoluto: a expressão gênica é impossível quando o gene está fisicamente separado do seu promotor (observe a posição do promotor *fljB* na Figura 28-27b). Um interruptor ligado/desligado absoluto pode ser importante nesse sistema (embora ele afete apenas um dos dois genes de flagelinas), uma vez que um flagelo com apenas uma cópia da flagelina errada pode ser vulnerável a anticorpos contra essa proteína. O sistema *Salmonella* não é de maneira ne-

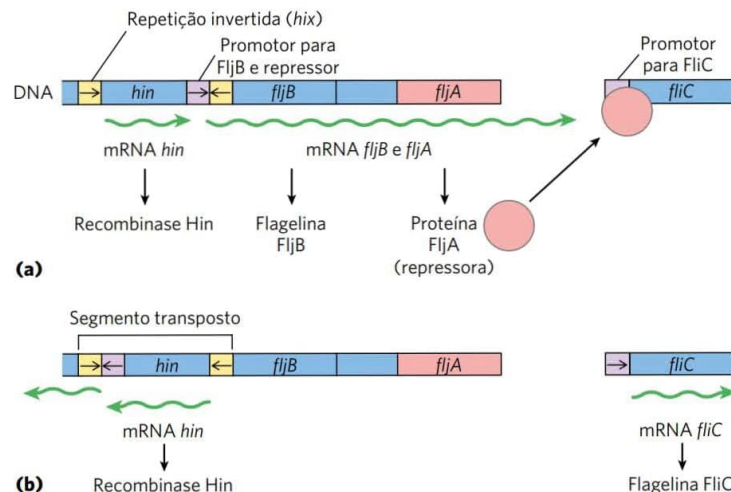


FIGURA 28-27 Regulação dos genes de flagelina em *Salmonella*: variação de fase. Os produtos dos genes *fliC* e *fljB* são flagelinas diferentes. O gene *hin* codifica a recombinase que catalisa a inversão do segmento de DNA contendo o promotor *fljB* e o gene *hin*. Os sítios de recombinação (repetições invertidas) são chamados de *hix* (em amarelo). (a) Em uma das orientações, *fljB* é expresso junto com uma proteína repressora (produto de um gene *fljA*) que reprime a transcrição do gene *fliC*. (b) Na orientação oposta, apenas o gene *fliC* é expresso; os genes *fljA* e *fljB* não podem ser transcritos. A interconversão entre esses dois estados, conhecida como variação de fase, também necessita de duas outras proteínas de ligação ao DNA inespecíficas (não mostradas), HU e FIS.

TABELA 28-1 Exemplos de regulação gênica por recombinação

Sistema	Recombinase/ sítio de recombinação	Tipo de recombinação	Função
Variação de fase (<i>Salmonella</i>)	Hin/ <i>hix</i>	Sítio-específica	A expressão alternativa de dois genes de flagelina permite a evasão da resposta imune do hospedeiro.
Hospedeiros (bacteriófago μ)	Gin/ <i>gix</i>	Sítio-específica	A expressão alternativa de dois conjuntos de genes de fibras caudais afeta a gama de hospedeiros.
Troca do tipo de acasalamento (levedura)	HO-endonuclease, proteína RAD52, outras proteínas/ <i>MAT</i>	Conversão de genes não recíproca ^a	A expressão alternativa de dois tipos de acasalamento de leveduras, a e α , cria células que podem se unir e sofrer meiose.
Variação antigênica (tripanosomos) ^b	Varia	Conversão gênica não recíproca ^a	A expressão sucessiva de diferentes genes codificando glicoproteínas variáveis de superfície (VSG) permite a evasão da resposta imune do hospedeiro.

^aNa conversão gênica não recíproca (classe de eventos de recombinação não discutida no Capítulo 25), a informação genética é movida de uma parte do genoma (onde é silenciosa) para outra (onde é expressa). A reação é semelhante à transposição replicativa (ver Figura 25-42).

^bOs tripanossomos provocam a doença do sono africana e outras doenças (ver Quadro 6-3). A superfície externa de um tripanossomo é composta por várias cópias de um único VSG, o antígeno principal de superfície. Uma célula pode mudar os antígenos de superfície em mais de 100 formas diferentes, impedindo que o sistema imune do hospedeiro faça uma defesa eficaz.

nhuma único. Sistemas regulatórios semelhantes ocorrem em outras bactérias e em alguns bacteriófagos. Além disso, sistemas de recombinação com funções semelhantes foram encontrados em eucariotos (Tabela 28-1). A regulação gênica por rearranjos de DNA que move genes e promotores é especialmente comum em patógenos que se beneficiam por alternarem entre hospedeiros ou alternarem as suas proteínas de superfície, suplantando os sistemas de defesa imune dos hospedeiros.

RESUMO 28.2 Regulação da expressão gênica em bactérias

- Além da repressão pelo repressor Lac, o óperon *lac* de *E. coli* sofre regulação positiva pela proteína receptora de cAMP (CRP). Quando a [glicose] é baixa, a [cAMP] é alta, e a CRP-cAMP se liga a um sítio específico no DNA, estimulando a transcrição do óperon *lac* e a produção de enzimas metabolizadoras de lactose. A presença de glicose deprime a [cAMP], diminuindo a expressão do *lac* e de outros genes envolvidos no metabolismo de açúcares secundários. Um grupo de óperons regulados coordenadamente é chamado de regulon.
- Óperons que produzem as enzimas da síntese de aminoácidos têm um circuito regulatório chamado de atenuação, que usa um sítio de terminação de transcrição (o atenuador) no mRNA. A formação do atenuador é modulada por um mecanismo que acopla transcrição e tradução e responde a pequenas alterações na concentração de aminoácidos.
- No sistema SOS, vários genes não ligados são reprimidos por um único repressor e induzidos simultaneamente

quando o dano no DNA dispara a proteólise autocatalítica do repressor, facilitada pela proteína RecA.

- Na síntese de proteínas ribossômicas, uma proteína em cada óperon de r-proteína atua como repressor da tradução. O mRNA é ligado pelo repressor, e a tradução é bloqueada apenas quando a r-proteína está presente com excesso de rRNA disponível.
- A regulação pós-transcricional de alguns mRNA é mediada por pequenos RNA que atuam em *trans* ou por ribocomutadores, parte da própria estrutura do mRNA, que atuam em *cis*.
- Alguns genes são regulados por processos de recombinação genética que movem os promotores em relação aos genes que estão sendo regulados. A regulação também pode ocorrer no nível da tradução.

28.3 Regulação da expressão gênica em eucariotos

A iniciação da transcrição é um ponto de regulação crucial para a expressão gênica em todos os organismos. Embora os eucariotos e as bactérias usem alguns mecanismos regulatórios semelhantes, a regulação da transcrição nos dois sistemas é fundamentalmente diferente.

Pode-se definir o estado basal de transcrição como a atividade inerente de promotores e da maquinaria de transcrição *in vivo* na ausência de sequências regulatórias. Em bactérias, a RNA-polimerase geralmente tem acesso a todos os promotores e pode se ligar a cada um deles e iniciar a transcrição com algum nível de eficiência mesmo na ausência de ativadores ou repressores. Em eucariotos, no

entanto, promotores fortes são, em geral, inativos *in vivo* sem a presença de proteínas regulatórias. Essa diferença fundamental traz à tona ao menos cinco características importantes que diferenciam a regulação da expressão gênica nos promotores de organismos eucarióticos em relação às bactérias.

Primeiro, o acesso a promotores eucarióticos é restrito pela estrutura da cromatina, e a ativação da transcrição está associada com várias mudanças na estrutura da cromatina na região transcrita. Segundo, embora as células eucarióticas possuam mecanismos regulatórios tanto positivos como negativos, os mecanismos positivos prevalecem. Praticamente cada gene eucariótico necessita de ativação para ser transcrito. Terceiro, mecanismos regulatórios envolvendo lncRNA são mais comuns na regulação da transcrição em eucariotos. Quarto, as células eucarióticas têm proteínas regulatórias multiméricas, maiores, mais complexas do que as bactérias. Por fim, a transcrição ocorre no núcleo eucariótico e, portanto, é separada da tradução, que ocorre no citoplasma, tanto no tempo como no espaço.

A complexidade dos circuitos regulatórios das células eucarióticas é extraordinária e ficará evidente com a discussão a seguir. Esta seção termina com a ilustração da descrição de um dos circuitos mais elaborados: a cascata regulatória que controla o desenvolvimento das moscas-da-fruta.

A cromatina ativa na transcrição é estruturalmente distinta da cromatina inativa

Os efeitos da estrutura do cromossomo na regulação gênica em eucariotos não possuem um paralelo claro em bactérias. No ciclo da célula eucariótica, os cromossomos da interfase parecem, à primeira vista, dispersos e amorfos (ver Figura 24-23). No entanto, várias formas de cromatina podem ser encontradas ao longo desses cromossomos. Cerca de 10% da cromatina em uma típica célula eucariótica estão em forma mais condensada do que o resto da cromatina. Esta forma, **heterocromatina**, é transcricionalmente inativa. A heterocromatina é geralmente associada a estruturas cromossômicas particulares – os centrômeros, por exemplo. A cromatina restante, menos condensada, é chamada de **eucromatina**.

A transcrição de um gene de eucariotos é fortemente reprimida quando o DNA está condensado no interior da heterocromatina. Parte da eucromatina, mas não toda, é ativa na transcrição. As regiões dos cromossomos transcricionalmente ativas são diferentes da heterocromatina em, pelo menos, três modos: o posicionamento dos nucleossomos, a presença de variantes de histonas e a modificação covalente dos nucleossomos. Essas mudanças estruturais na cromatina associadas à transcrição são coletivamente chamadas de **remodelação da cromatina**. Esse remodelamento utiliza um conjunto de enzimas que promovem essas mudanças (Tabela 28-2).

Quatro famílias conhecidas de complexos de remodelação da cromatina, que se diferenciam pelas suas características estruturais, atuam diretamente para modificar a composição do nucleossomo nas regiões transcritas. Eles podem desenrolar, translocar, remover ou trocar nucleossomos no DNA, hidrolisando ATP durante o processo

(Tabela 28-2; ver nota de rodapé da tabela para uma explicação sobre a abreviação dos nomes dos complexos enzimáticos que são descritos a seguir). Em alguns casos, as enzimas catalisam a troca de pares de histonas nos nucleossomos para alterar a composição do nucleossomo. Muitos complexos diferentes são especializados para funcionarem em determinados genes ou regiões do cromossomo. Existem dois complexos relacionados na família **SWI/SNF** em todas as células eucarióticas, e os dois remodelam a cromatina de modo que o espaçamento entre os nucleossomos seja mais irregular. Eles também estimulam a ligação de fatores de transcrição. O complexo inclui um componente, chamado de domínio de bromo, perto da terminação carboxila da subunidade ATPase ativa, o qual interage com as caudas de histonas acetiladas. Em geral, esses dois complexos distintos funcionam em conjuntos diferentes de genes. A maioria dos complexos da família **ISWI** otimiza o espaçamento dos nucleossomos para permitir a organização da cromatina e o silenciamento da transcrição. Em geral, existem de 9 a 10 complexos da família **CHD** nas células eucarióticas, divididos em três subfamílias. Os diferentes membros de cada família possuem papéis especializados, expondo nucleossomos para ativar a transcrição ou compactando a cromatina para reprimir a transcrição. Os complexos da família **INO80** têm vários papéis no remodelamento da cromatina para ativar a transição e o reparo de DNA. Um membro da família, **SWR1**, promove a troca de subunidades nos nucleossomos para indução de variantes de histonas, como a H2AZ (ver Quadro 24-2), encontradas nas regiões de transcrição ativa. A ação desses complexos não é completamente conhecida, mas sabe-se que eles são essenciais para a ativação da transcrição.

A modificação covalente de histonas é alterada drasticamente no interior da cromatina transcricionalmente ativa. O núcleo de histonas (H2A, H2B, H3, H4; ver Figura 24-25) das partículas dos nucleossomos é modificado pela metilação de resíduos Lys ou Arg, fosforilação de resíduos de Ser ou Thr, acetilação (ver a seguir), ubiquitinação (ver Figura 27-49) ou sumoilação. Cada uma das histonas do núcleo dos nucleossomos apresenta dois domínios estruturais distintos. Um domínio central está envolvido na interação histona-histona e no enrolamento do DNA em torno do nucleossomo. Um domínio aminoterminal rico em lisina está geralmente posicionado próximo do exterior da partícula do nucleossomo montado; as modificações covalentes ocorrem em resíduos específicos concentrados nesse domínio aminoterminal. Os padrões de modificação levaram alguns pesquisadores a propor a existência de um código para as histonas, no qual padrões de modificação são reconhecidos por enzimas que alteram a estrutura da cromatina. De fato, algumas das modificações são essenciais para interações com proteínas que desempenham papéis-chave na transcrição.

A acetilação e a metilação de histonas têm papel destacado nos processos que ativam a cromatina para a transcrição. Durante a transcrição, a histona H3 é metilada (por metilases específicas para histonas) na Lys⁴ em nucleossomos, perto da extremidade 5' da região codificadora, e na Lys³⁶, dentro da região codificadora. Essas metilações facilitam a ligação das **histona-acetiltransferases (HATs)**, enzimas que acetilam resíduos específicos de Lys. HAT citosólicas

TABELA 28-2 Alguns complexos enzimáticos que catalisam mudanças estruturais na cromatina associadas à transcrição

Complexo enzimático ^a	Estrutura oligomérica (nº de polipeptídeos)	Fonte	Atividades
O movimento, a substituição e a edição de histonas necessitam de ATP			
Família SWI/SNF	8-17 $M_r > 10^6$	Eucariotos	Remodelagem de nucleossomos; ativação da transcrição.
Família ISWI	2-4	Eucariotos	Remodelamento de nucleossomos; repressão da transcrição; ativação da transcrição em alguns casos.
Família CHD	1-10	Eucariotos	Remodelamento de nucleossomos; exposição de nucleossomos para ativação da transcrição; alguns têm papel como repressores.
Família INO80	> 10	Eucariotos	Remodelamento de nucleossomos e ativação da transcrição; membros da família SWR1 participam na substituição de H2A-H2B por H2AZ-H2B.
Modificação de histonas			
GCN5-ADA2-ADA3	3	Leveduras	GCN5 tem atividade de HAT tipo A.
SAGA/ PCAF	> 20	Eucariotos	Inclui GCN5-ADA2-ADA3; acetila resíduos em H3, H2B, H2AZ.
NuA4	≥ 12	Eucariotos	Componente Esa1 tem atividade HAT; acetila H4, H2A e H2AZ.
Chaperonas de histonas não necessitam de ATP			
HIRA	1	Eucariotos	Deposição de H3.3 durante a transcrição.

^aAs abreviações dos genes e das proteínas de eucariotos geralmente são mais confusas ou obscuras do que as abreviações usadas para bactérias. SWI (troca, *switching*) foi descoberta como uma proteína necessária para a expressão de certos genes envolvidos na troca do tipo de acasalamento em leveduras, e SNF (sacarose não fermentadora) como um fator de expressão do gene de leveduras para sacarase. Estudos posteriores revelaram várias proteínas SWI e SNF atuando em um complexo. O complexo SWI/SNF tem papel na expressão de um amplo número de genes e foi encontrado em muitos eucariotos, inclusive em seres humanos. ISWI é uma imitação de SWI. CHD é um cromodomínio, *helicase*, ligação ao DNA; INO80 (requer *inositol 80*); e SWR1, *SWI2*/Snf2 relacionado com a ATPase 1. O complexo de proteínas GCN5 (controle geral não desrepressível) e ADA (alteração/ativação da deficiência) foi descoberto durante a investigação da regulação dos genes do metabolismo do nitrogênio em leveduras. Essas proteínas podem fazer parte do complexo maior SAGA (SPF, ADA2, 3, GCN5, acetiltransferase) em leveduras. O equivalente do SAGA nos seres humanos é o PCAF (fator associado a p300/CBP). NuA4 é a acetiltransferase de nucleossomos de H4; ESA1 é a acetiltransferase essencial relacionada à SAS2. HIRA é o regulador A de histonas.

(tipo B) acetilam histonas recém-sintetizadas antes que elas sejam transferidas para o núcleo. A posterior montagem de histonas na cromatina após a replicação é facilitada pelas chaperonas de histonas: CAF1 para H3 e H4, (ver Quadro 24-2) e NAP1 para H2A e H2B.

Onde a cromatina está sendo ativada para transcrição, as histonas nucleossômicas são ainda mais acetiladas por HAT nucleares (tipo A). A acetilação de vários resíduos Lys nos domínios aminoterminais das histonas H3 e H4 pode reduzir a afinidade de todo o nucleossomo ao DNA. A acetilação de resíduos Lys específicos é crucial para a interação de nucleossomos com outras proteínas. Quando a transcrição de um gene não é mais necessária, o grau de acetilação dos nucleossomos naquela vizinhança é reduzido pela atividade das **desacetilases de histonas (HDAC)**, como parte de um processo geral de silenciamento de genes que remete a cromatina a um estado transcricionalmente inativo. Entre as desacetilases podemos incluir SIRT1, SIRT2, SIRT6 e SIRT7, enzimas dependentes de NAD⁺ que pertencem à família sirtuína (SIRT1-7 nos mamíferos). Essas enzimas desacetilam resíduos de Lys específicos em histonas e outros alvos citoplasmáticos. Além da remoção de certos

grupos acetila, novas modificações covalentes de histonas marcam a cromatina para ficar transcricionalmente inativa. Por exemplo, na heterocromatina, a Lys⁹ da histona H3 é geralmente metilada.

O efeito final da remodelação da cromatina no contexto da transcrição é o de tornar um segmento de cromossomo mais acessível e “marcá-lo” (modificar quimicamente) para facilitar a ligação e a atividade dos fatores de transcrição que regulam a expressão do gene ou dos genes daquela região.

A maioria dos promotores eucarióticos é regulada positivamente

Como observado anteriormente, as RNA-polimerases de eucariotos têm pouca ou nenhuma afinidade intrínseca por promotores, e a iniciação da transcrição é quase sempre dependente da ação de muitas proteínas ativadoras. Uma razão importante para esse evidente predomínio da regulação positiva parece óbvia: o armazenamento do DNA no interior da cromatina efetivamente torna a maioria dos promotores inacessíveis, de modo que os genes permanecem silenciosos na ausência de outra regulação. A estrutura da cromatina

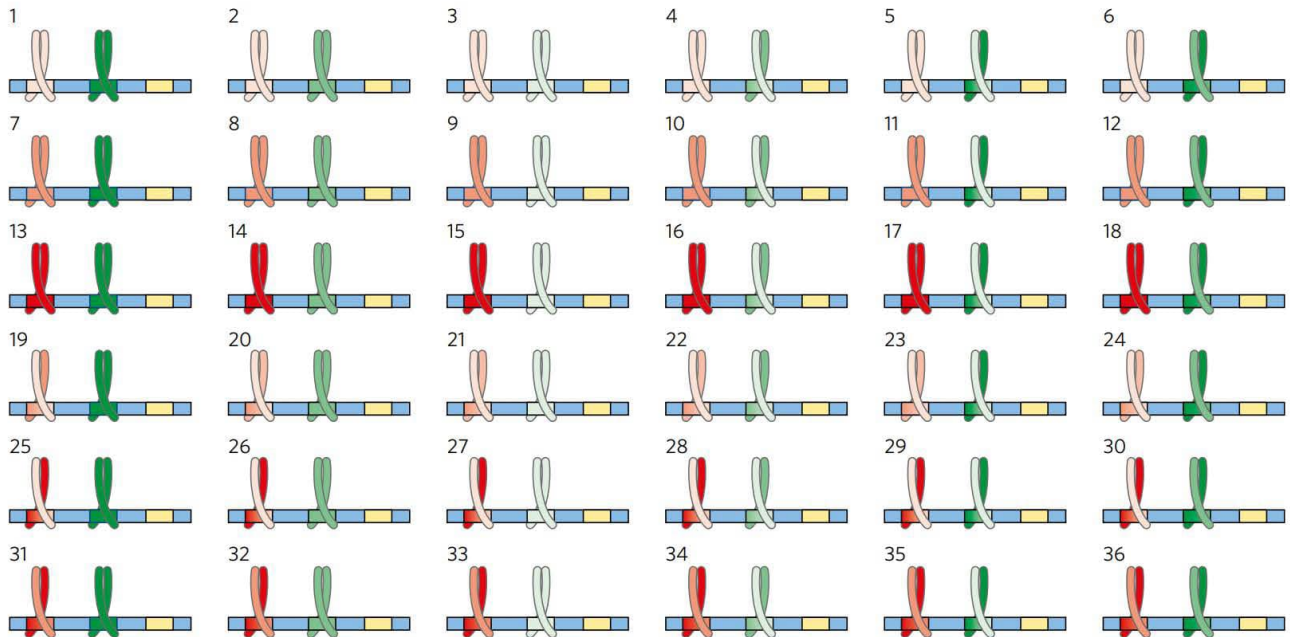


FIGURA 28-28 As vantagens do controle combinatório. O controle combinatório permite a regulação específica de vários genes, usando um repertório limitado de proteínas regulatórias. Considere as possibilidades inerentes à regulação por duas famílias diferentes de proteínas zíper de leucina (em vermelho e verde). Se cada família de genes reguladores tivesse três membros (como mostrados aqui, em tons escuro, intermediário e claro, cada um ligando-se a uma sequência diferente de DNA) que podem formar tanto homodímeros quanto heterodímeros, existiriam seis espécies diméricas possíveis em cada família e cada dímero poderia reconhecer uma sequência de DNA regulatória bipartida diferente. Se um gene tivesse um sítio regulatório para cada família de proteína, seriam possíveis 36 combinações regulatórias diferentes, usando-se apenas seis proteínas dessas duas famílias. Com seis ou mais sítios usados na regulação de um gene eucariótico típico, o número de variantes possíveis é muito maior do que esse exemplo sugere.

tina afeta mais o acesso a alguns promotores do que outros e repressores que se ligam ao DNA de modo a impedir o acesso da RNA-polimerase (regulação negativa) seriam, na maioria das vezes, simplesmente redundantes. Outros fatores devem estar em jogo no uso da regulação positiva e geralmente especulações sobre isso se centram em torno de dois pontos: o tamanho grande dos genomas eucarióticos e a maior eficiência da regulação positiva.

Primeiro, a ligação inespecífica de DNA de proteínas regulatórias passa a ser um problema importante nos genomas dos eucariotos superiores, que são muito maiores. Além do mais, a chance de que uma única sequência de ligação específica ocorra aleatoriamente em um local inadequado também aumenta com o tamanho do genoma. Um controle combinatório, portanto, passa a ter grande importância em genomas grandes (**Figura 28-28**). A especificidade pela ativação da transcrição pode ser melhorada se cada uma de várias proteínas regulatórias positivas ligar sequências de DNA específicas para ativar um gene. O número médio de sítios regulatórios para um gene em um organismo pluricelular é seis, e são comuns genes regulados por uma dúzia desses sítios. A necessidade de ligação de várias proteínas regulatórias positivas a sequências específicas de DNA reduz enormemente a probabilidade de ocorrência aleatória de uma justaposição funcional de todos os sítios de ligação necessários. Além disso, o número de proteínas regulatórias que deve ser codificado por um genoma para regular todos os seus genes pode ser reduzido (**Figura 28-28**). Portanto, não é necessário um novo regulador para cada gene (embora a regulação seja su-

ficientemente complexa em eucariotos superiores), de modo que as proteínas regulatórias podem representar 5 a 10% de todos os genes que codificam proteínas.

Em princípio, uma estratégia combinatória semelhante poderia ser usada por vários elementos regulatórios negativos, mas isso nos leva à segunda razão para o uso da regulação positiva: ela é simplesmente mais eficiente. Se os aproximadamente 20 mil genes presentes no genoma humano fossem regulados negativamente, cada célula teria de sintetizar, em todos os momentos, todos os diferentes repressores em concentrações suficientes para permitir a ligação específica a cada gene “indesejado”. Em uma regulação positiva, a maioria dos genes é geralmente inativa (i.e., as RNA-polimerases não se ligam aos promotores) e a célula sintetiza apenas as proteínas ativadoras necessárias para promover a transcrição de um subconjunto de genes necessário na célula naquele momento.

Apesar desses argumentos, há exemplos de regulação negativa em eucariotos, desde leveduras até seres humanos, como será visto. Algumas dessas regulações negativas envolvem lncRNA, cuja síntese é mais econômica do que a síntese de proteínas repressoras.

Ativadores de ligação ao DNA e coativadores facilitam a montagem dos fatores gerais de transcrição

Continuando o estudo da regulação da expressão gênica em eucariotos, serão abordadas as interações entre promotores e RNA-polimerase II (Pol II), a enzima responsável pela

síntese de mRNA de eucariotos. Embora muitos (mas não todos) promotores Pol II incluam caixa TATA e sequências Inr (iniciadoras), com seu espaçamento padrão (ver Figura 26-8), eles variam enormemente tanto no número quanto na localização de sequências adicionais necessárias para a regulação da transcrição.

Sequências regulatórias adicionais, geralmente ligadas por ativadores de transcrição, são geralmente chamadas de **potencializadores** (*enhancers*) em eucariotos superiores e **sequências ativadoras a montante (UAS)** em leveduras. Um típico potencializador pode ser encontrado a centenas ou mesmo milhares de pares de bases a montante do início do sítio de transcrição, ou até mesmo a jusante dele, dentro do próprio gene. Quando ligado pelas proteínas regulatórias apropriadas, um potencializador aumenta a transcrição nos promotores vizinhos independentemente de sua orientação no DNA. As UAS de leveduras funcionam de modo semelhante, embora geralmente elas devam estar posicionadas a montante e a uma distância inferior a algumas centenas de pares de bases do sítio de iniciação de transcrição.

Uma ligação efetiva da holoenzima Pol II a um dos seus promotores geralmente necessita da ação combinada de cinco tipos diferentes de proteínas (1) **ativadores da transcrição**, que ligam potencializadores ou UAS e facilitam a transcrição; (2) **reguladores arquitetônicos**, que facilitam a formação de alças no DNA; (3) **modificadores da cromatina e proteínas remodeladoras**, descritas acima; (4) **coativadores**; e (5) **fatores de transcrição basais**, também chamados de fatores de transcrição gerais (ver Figura 26-9, Tabela 26-2), necessários para a maioria

dos promotores Pol II (**Figura 28-29**). Os coativadores são essenciais para a comunicação entre os ativadores e o complexo formado entre a Pol II e os fatores de transcrição basais. Os coativadores também desempenham um papel direto na montagem do complexo de pré-iniciação (PIC). Além disso, várias proteínas repressoras podem interferir

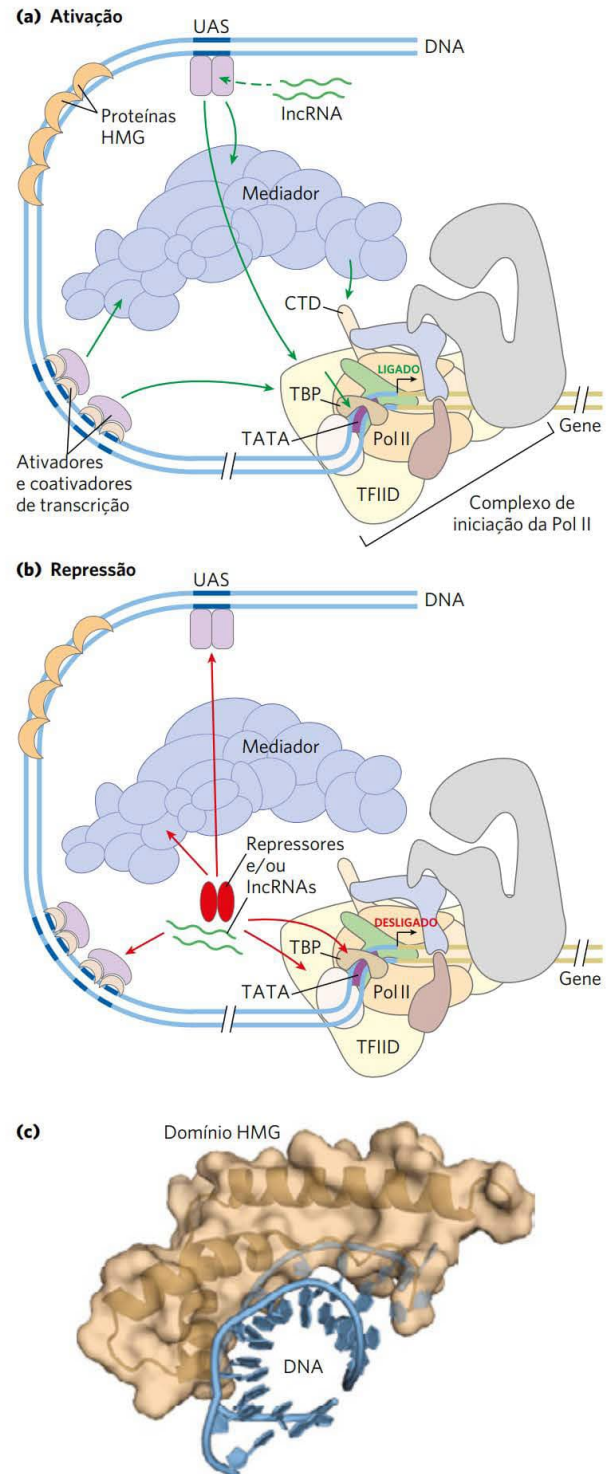


FIGURA 28-29 Promotores eucarióticos e proteínas regulatórias. A RNA-polimerase II e seus respectivos fatores de transcrição basal (geral) formam um complexo pré-iniciação na caixa TATA e o sítio Inr dos promotores cognatos, um processo facilitado pelos ativadores de transcrição, atuando por meio de coativadores (mediador, TFIID ou ambos). **(a)** Um promotor composto com elementos de sequência típicos e complexos proteicos, encontrado tanto em leveduras quanto em eucariotos superiores. O domínio carboxiterminal (CTD) da Pol II (ver Figura 26-9) é um importante ponto de interação com o Mediador e outros complexos de proteínas. Enzimas de modificação de histonas (não mostradas) catalisam a metilação e a acetilação; enzimas de remodelamento alteram o conteúdo e a localização dos nucleossomos. Os ativadores da transcrição têm domínios de ligação de DNA e domínios de ativação distintos. Em alguns casos, as suas funções são afetadas pela interação com lncRNA. As setas verdes indicam modos de interação comuns que geralmente são necessários para a ativação da transcrição, como discutido no texto. As proteínas HMG são um tipo comum de regulador arquitetônico (ver Figura 28-5), facilitando a formação das alças de DNA necessárias para colocar juntos componentes do sistema ligados em sítios de ligação distantes. **(b)** Os repressores da transcrição em organismos eucarióticos funcionam por meio de vários mecanismos. Alguns se ligam diretamente ao DNA, deslocando o complexo proteico necessário para a ativação (não mostrado); muitos outros interagem com várias partes dos complexos proteicos para impedir a ativação. Os pontos possíveis de interação estão indicados com setas vermelhas. **(c)** A estrutura de um complexo proteico HMG com DNA mostra como as proteínas HMG facilitam a formação de alças no DNA. A ligação é relativamente inespecífica, embora preferências de sequência de DNA tenham sido identificadas para várias proteínas HMG. A figura mostra o domínio HMG da proteína HMG-D de *Drosophila* ligado ao DNA. [Fonte: (c) PDB ID 1QRV, F.V. Murphy IV et al., *EMBO J.* 18:6610, 1999.]

na comunicação entre Pol II e ativadores e fazer a transcrição ser reprimida (Figura 28-29b). Agora, o foco será nos complexos de proteínas mostrados na Figura 28-29 e como eles interagem para ativar a transcrição.

Ativadores da transcrição As necessidades por ativadores variam enormemente de um promotor para o outro. Alguns são conhecidos por ativarem a transcrição de centenas de promotores, ao passo que outros são específicos para poucos promotores. Muitos ativadores são sensíveis à ligação de moléculas sinalizadoras, propiciando a capacidade de ativar ou desativar a transcrição em resposta a um ambiente celular em mudança. Alguns potencializadores ligados por ativadores estão muito distantes da caixa TATA do promotor. Potencializadores múltiplos (frequentemente seis ou mais) são ligados por um número semelhante de ativadores para um gene típico, fornecendo controle combinatório e resposta a múltiplos sinais.

Alguns ativadores da transcrição podem se ligar tanto a DNA quando a RNA e as suas funções são afetadas por um ou mais lncRNA. A proteína NF- κ B, por exemplo, ativa a transcrição de muitos genes envolvidos na resposta imune e na produção de citocinas. Ela pode se ligar a um sítio potencializador no DNA e, alternativamente, a um lncRNA, denominado *lethe* (Figura 28-14; assim denominado em função do rio do esquecimento da mitologia grega). O lncRNA reduz a transcrição de genes controlados por NF- κ B.

Reguladores arquitetonômicos Como é que os ativadores funcionam a distância? A resposta, na maioria dos casos, parece ser que, como indicado anteriormente, o DNA interveniente faz uma alça, de modo que vários complexos de proteínas podem interagir diretamente. A formação da alça é estimulada por reguladores arquitetonômicos que são abundantes na cromatina e se ligam ao DNA com especificidade limitada. Com mais destaque, as proteínas do **grupo de alta mobilidade (HMG)** (Figura 28-29c; “alta mobilidade” refere-se à mobilidade eletroforética em géis de poliacrilamida) desempenham um papel estrutural importante na remodelação da cromatina e na ativação da transcrição.

Complexos proteicos coativadores A maioria da transcrição necessita da presença de complexos proteicos adicionais. Alguns dos principais complexos proteicos de proteínas reguladoras que interagem com a Pol II foram definidos tanto genética quanto bioquimicamente. Esses complexos coativadores atuam como intermediários entre os ativadores da transcrição e o complexo Pol II.

Um coativador eucariótico de grande importância, formado por aproximadamente 20 a 30 polipeptídeos, é denominado **Mediador** (Figura 28-29). Muitos dos 20 polipeptídeos nucleares são altamente conservados desde fungos até seres humanos. Um complexo adicional de quatro subunidades pode interagir com o Mediador e inibir a iniciação da transcrição. O Mediador se liga fortemente ao domínio carboxiterminal (CTD) da maior subunidade de Pol II. O complexo Mediador é necessário tanto para a transcrição basal quanto para a regulada em vários dos promotores usados pela Pol II e estimula a fosforilação de CTD pela TFIIF (fator de transcrição basal). Os ativadores da transcrição interagem com um ou mais componentes do complexo Me-

diador, com os sítios de interação precisa diferindo de um ativador para outro. Complexos coativadores funcionam na caixa TATA do promotor ou perto dela.

Coativadores adicionais, funcionando com um ou poucos genes, também foram descritos. Alguns deles operam em conjunto com o Mediador, outros podem atuar em sistemas que não empregam o Mediador.

Proteínas que ligam TATA e fatores de transcrição basais A **proteína de ligação à TATA (TBP)** é o primeiro componente a se ligar na montagem do **complexo de pré-iniciação (PIC)**. Ela se liga à caixa TATA de um promotor Pol II. Nos promotores que não possuem caixa TATA, a TBP geralmente é disponibilizada como um complexo grande (13 a 14 subunidades), denominado TFIID. O complexo todo também inclui os fatores de transcrição basal TFIIB, TFIIE, TFIIF, TFIIH; Pol II; e talvez, TFIIA. O PIC mínimo, no entanto, geralmente é insuficiente para a iniciação da transcrição e não se forma caso o promotor esteja escondido no interior da cromatina. A regulação positiva, levando à transcrição, é imposta pelos ativadores e os coativadores. O Mediador interage diretamente com TFIIH e TFIIE e os faz serem recrutados para o PIC.

Coreografia da ativação da transcrição Agora, pode-se juntar as peças da sequência de eventos da ativação da transcrição em um promotor Pol II típico (**Figura 28-30**). A ordem exata de ligação de alguns componentes pode variar, mas o modelo na Figura 28-30 ilustra os princípios de ativação, bem como uma via comum. Muitos ativadores de transcrição têm uma afinidade significativa por seus sítios de ligação, mesmo quando os sítios estão dentro da cromatina condensada. Em geral, a ligação dos ativadores é um evento que dispara a ativação subsequente do promotor. A ligação de um ativador pode permitir a ligação de outros, deslocando gradualmente alguns nucleossomos.

Então, ocorre uma remodelação da cromatina em estágios, facilitada por interações entre ativadores e HAT ou complexos enzimáticos, como SWI/SNF (ou ambos). Desse modo, a ligação de um ativador pode envolver outros componentes necessários para a remodelação adicional da cromatina e permitir a transcrição de genes específicos. Os ativadores ligados interagem com o grande complexo Mediador. O Mediador, por sua vez, fornece uma superfície de montagem para a ligação, primeiro, da TBP (ou TFIID), e, em seguida, da TFIIB, e então de outros componentes do PIC, incluindo a RNA-polimerase II. O Mediador estabiliza a ligação da Pol II e os seus fatores de transcrição associados e facilita muito a formação do PIC. A complexidade nesses circuitos regulatórios é a regra, e não a exceção, com vários ativadores ligados ao DNA promovendo a transcrição.

O roteiro pode mudar de um promotor para outro. Por exemplo, muitos promotores têm um conjunto diferente de sequências de reconhecimento e podem não ter uma caixa TATA e, em eucariotos pluricelulares, a composição de subunidades de fatores, como o TFIID, pode variar de um tecido para outro. Entretanto, parece que a maioria dos promotores necessita de um conjunto precisamente ordenado de componentes para iniciar a transcrição. O processo de montagem nem sempre é rápido. Pode levar minutos para alguns genes, e dias para certos genes de eucariotos superiores.

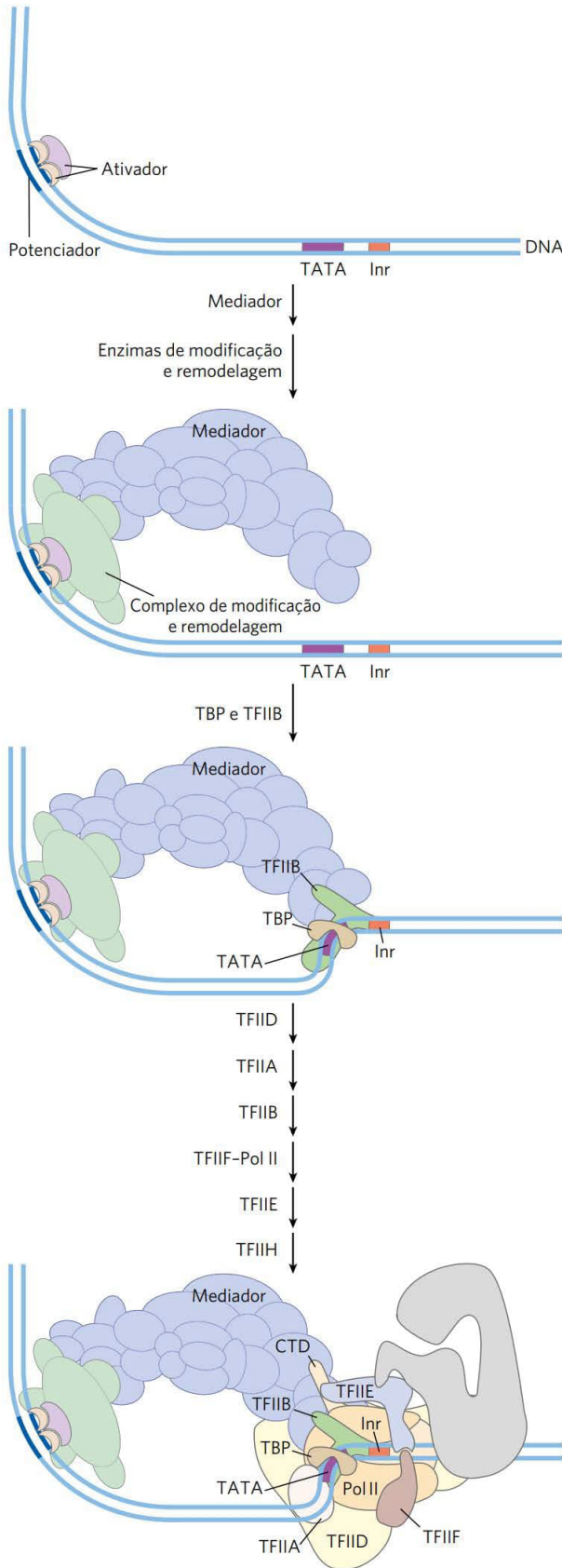
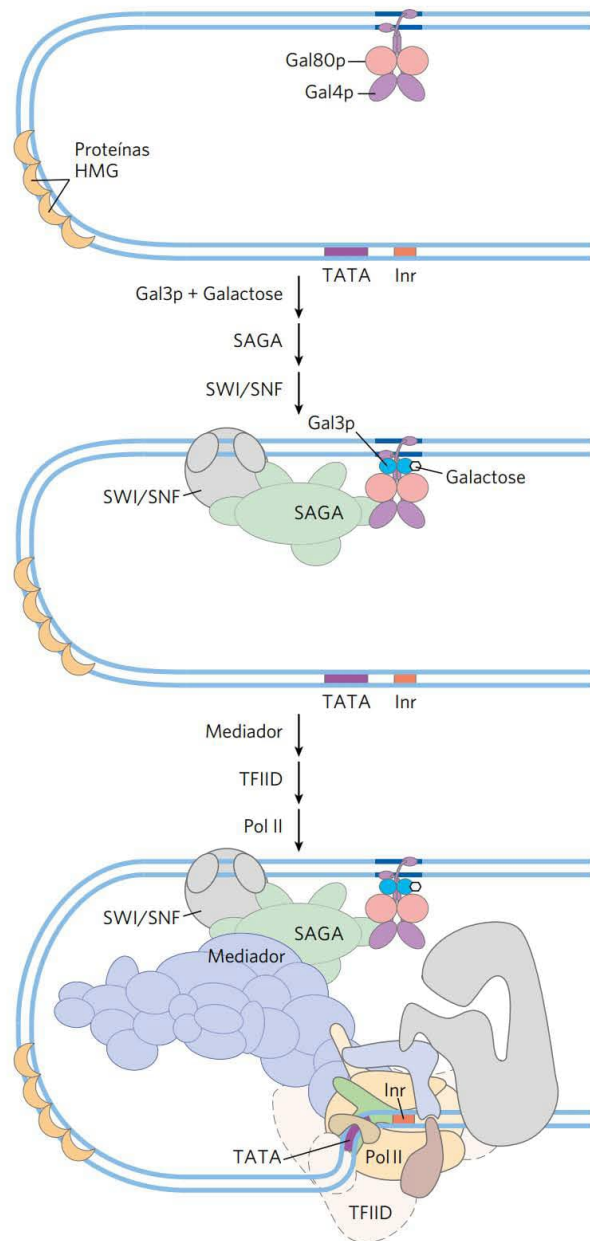


FIGURA 28-30 Os componentes de ativação da transcrição. Os ativadores primeiro se ligam ao DNA. Eles recrutam complexos de modificação de histonas/remodelamento de nucleossomos e coativadores, como o Mediador. O Mediador facilita a ligação de TBP (ou TFIID) e TFIIB, e, então, outros fatores de transcrição basal e a Pol II se ligam. A fosforilação do domínio carboxiterminal (CTD) da Pol II leva à iniciação da transcrição (não mostrado). [Fonte: informações de J. A. D'Alessio et al., *Mol. Cell* 36:924, 2009.]

Ativação reversível da transcrição Embora seja raro, algumas das proteínas regulatórias dos organismos eucarióticos que se ligam a promotores Pol II e que interagem com ativadores da transcrição podem agir como repressores, inibindo a formação de PIC ativos (Figura 28-30). Alguns ativadores podem adotar diferentes conformações e, assim, podem ser capazes de servir como ativadores de transcrição ou como repressores. Por exemplo, alguns receptores de hormônios esteroides (descritos posteriormente) funcionam no núcleo como ativadores da transcrição, estimulando a transcrição de determinados genes quando um hormônio esteroide específico está presente. Na ausência do hormônio, as proteínas receptoras reverterem a uma conformação repressora, impedindo a formação de PIC. Em alguns casos, essa repressão envolve a interação com histonas-desacetilases e outras proteínas que ajudam a restaurar a cromatina ao redor para seu estado transcricional inativo. O Mediador, quando as subunidades inibitórias estiverem incluídas, pode também bloquear a iniciação da transcrição. Esse pode ser um mecanismo regulatório para garantir a montagem ordenada do PIC (ao atrasar a ativação da transcrição até que todos os fatores necessários estejam presentes) ou pode ser um mecanismo que ajude a desativar promotores quando a transcrição não é mais necessária.

Os genes do metabolismo da galactose em leveduras estão sujeitos às regulações positiva e negativa

Alguns dos princípios gerais descritos acima podem ser ilustrados por um circuito regulatório eucariótico bem estudado (Figura 28-31). As enzimas necessárias para a importação e o metabolismo de galactose em leveduras são codificadas por genes espalhados por vários cromossomos (Tabela 28-3). Cada um dos genes *GAL* é transcrito separadamente, e as células de leveduras não têm óperons como aqueles de bactérias. Entretanto, todos os genes *GAL* apresentam promotores semelhantes e são regulados coordenadamente por um conjunto comum de proteínas. Os promotores dos genes *GAL* são constituídos pela caixa TATA e pelas sequências *Inr*, bem como por uma sequência ativadora a montante (UAS_G) reconhecida pela proteína ativadora da transcrição Gal4 (Gal4p). A regulação da expressão gênica pela galactose envolve uma ação recíproca entre a Gal4p e duas outras proteínas, Gal80p e Gal3p (Figura 28-31). A Gal80p forma um complexo com a Gal4p, impedindo a Gal4p de funcionar como um ativador dos promotores *GAL*. Quando a galactose está presente, ela se liga à Gal3p, que, então, interage com o complexo Gal80p-Gal4p e funciona como um ativador dos promotores *GAL*. À medida que vários genes da galactose são induzidos e os seus produtos são formados, a Gal3p pode ser substituída pela Gal1p (uma galactocinase necessária



para o metabolismo da galactose que também age como regulador) para sustentar a ativação do circuito regulatório.

Outros complexos proteicos também desempenham papéis na ativação da transcrição dos genes *GAL*. Entre eles, inclui-se o complexo SAGA para a acetilação de histonas e remodelação da cromatina, o complexo SWI/SNF para a remodelação da cromatina e o Mediador. A proteína Gal4 é responsável pelo recrutamento desses fatores adicionais necessários para a ativação da transcrição. O SAGA pode ser o primeiro e principal alvo de recrutamento para Gal4p.

A glicose é a fonte de carbono preferida por leveduras, assim como por bactérias. Na presença de glicose, a maioria dos genes *GAL* estão reprimidos, quer a galactose esteja presente ou não. O sistema regulatório *GAL* descrito acima é efetivamente substituído por um complexo sistema de re-

FIGURA 28-31 Regulação da transcrição de genes *GAL* em leveduras. A galactose importada para dentro da célula de levedura é convertida em galactose-6-fosfato por uma via que envolve seis enzimas, cujos genes estão espalhados por três cromossomos (ver Tabela 28-3). A transcrição desses genes é regulada pelas ações combinadas das proteínas Gal4p, Gal80p e Gal3p, com Gal4p desempenhando o papel central de ativador da transcrição. O complexo Gal4p-Gal80p é inativo. A ligação da galactose à Gal3p leva à interação da Gal3p com o complexo Gal80p-Gal4p e ativa a Gal4p. A seguir, a Gal4p recruta SAGA, Mediador e TFIID para os promotores de galactose, levando ao recrutamento da RNA-polimerase II e à iniciação da transcrição. A remodelação da cromatina para permitir a transcrição também necessita do complexo SWI/SNF.

pressão de catabólitos que inclui várias proteínas (não mostrado na Figura 28-31).

Ativadores da transcrição têm estrutura modular

Em geral, os ativadores da transcrição têm um domínio estrutural diferente para a ligação específica do DNA e um ou mais domínios para a ativação da transcrição ou para a interação com outras proteínas regulatórias. A interação de duas proteínas regulatórias geralmente é mediada por domínios contendo zíperes de leucina (Figura 28-15) ou motivos hélice-alça-hélice (Figura 28-16). Agora, serão vistos três tipos diferentes de domínios estruturais usados na ativação de fatores de transcrição, Gal4p, Sp1 e CTF1 (Figura 28-32a).

A Gal4p contém, no domínio de ligação a DNA, uma estrutura semelhante a um dedo de zinco, perto da extremidade aminoterminal; esse domínio tem seis resíduos Cys que coordenam dois Zn^{2+} . A proteína funciona como homodímero (com a dimerização mediada pelas interações entre duas espirais espiraladas) e se liga à UAS_G, uma sequência palindrômica de DNA de cerca de 17 pb de comprimento. A Gal4p tem um domínio de ativação separado com muitos resíduos de aminoácidos ácidos. Experimentos que substituem uma variedade de diferentes sequências peptídicas pelo **domínio de ativação ácido** da Gal4p sugerem que a natureza ácida desse domínio seja fundamental para seu funcionamento, embora a sequência precisa de aminoácidos possa variar consideravelmente.

O Sp1 (M_r 80.000) é um ativador da transcrição de muitos genes em eucariotos superiores. O sítio de ligação ao DNA, a caixa GC (sequência-consenso GGGCGG) está geralmente muito perto da caixa TATA. O domínio de ligação de DNA da proteína Sp1 está próximo da extremidade C-terminal e contém três dedos de zinco. Dois outros domínios na Sp1 funcionam na ativação e são notáveis pelo fato de que 5% dos resíduos de aminoácidos são Gln. Um grande número de outras proteínas ativadoras também apresenta esses **domínios ricos em glutamina**.

O CTF1 (fator de transcrição 1 ligado a CCAAT) pertence a uma família de ativadores de transcrição que se liga a uma sequência chamada de sítio CCAAT (a sua sequência-consenso é TGGN₆GCCAA, em que N é um nucleotídeo qualquer). O domínio de ligação de DNA do CTF1 contém muitos resíduos de aminoácidos básicos, e a região de ligação é provavelmente disposta como uma α -hélice. Essa proteína não apresenta nem um motivo hélice-volta-hélice nem um motivo dedo de zinco; seu mecanismo de ligação a DNA ainda não é claro. O CTF1 tem um **domínio de ativa-**

TABELA 28-3 Genes do metabolismo da galactose em leveduras

Gene	Função proteica	Localização nos cromossomos	Tamanho da proteína (número de resíduos)	Expressão proteica relativa em diferentes fontes de carbono		
				Glicose	Glicerol	Galactose
Genes regulados						
<i>GAL1</i>	Galactocinase	II	528	—	—	+++
<i>GAL2</i>	Galactose-permease	XII	574	—	—	+++
<i>PGM2</i>	Fosfoglico-mutase	XIII	569	+	+	++
<i>GAL7</i>	Galactose-1-fosfato uridilil-transferase	II	365	—	—	+++
<i>GAL10</i>	UDP-glicose-4-epimerase	II	699	—	—	+++
<i>MEL1</i>	α -Galactosidase	II	453	—	+	++
Genes reguladores						
<i>GAL3</i>	Indutor	IV	520	—	+	++
<i>GAL4</i>	Ativador da transcrição	XVI	881	+/—	+	+
<i>GAL80</i>	Inibidor da transcrição	XIII	435	+	+	++

Fonte: informações de R. Reece e A. Platt, *Bioessays* 19:1001, 1997.

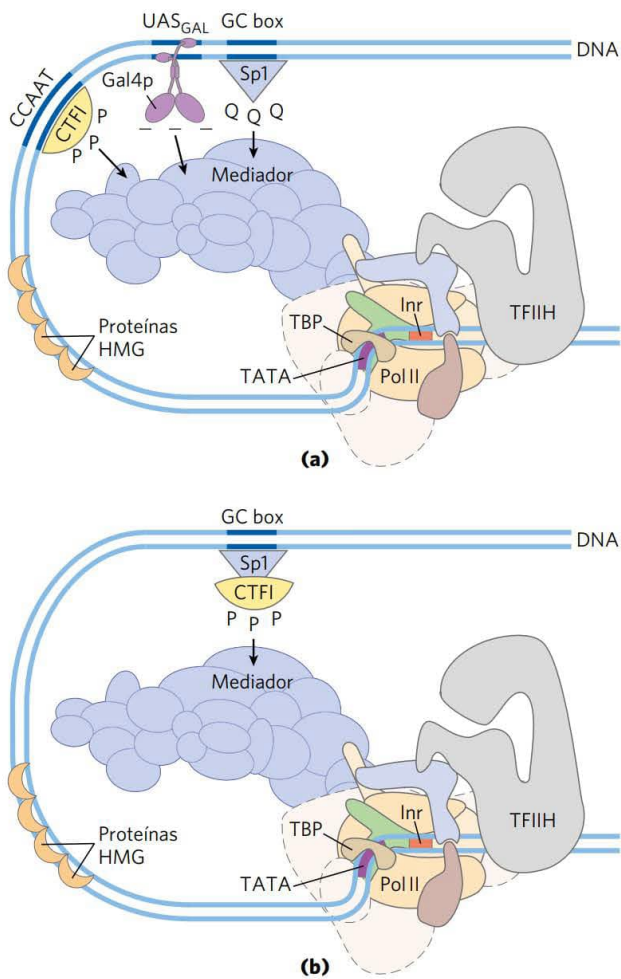
ção rico em prolina, com Pro perfazendo mais de 20% dos resíduos de aminoácidos.

A ativação discreta e os domínios de ligação do DNA das proteínas regulatórias muitas vezes atuam de modo completamente independente, como foi demonstrado em experimentos de “troca de domínios”. Técnicas de engenharia genética (Capítulo 9) podem unir o domínio de ativação rico em prolina do CTF1 ao domínio de ligação ao DNA do Sp1 para criar uma proteína que, como o Sp1 intacto, liga-se a caixas GC no DNA e ativa a transcrição em um promotor que esteja próximo (como na Figura 28-32b). O domínio de ligação ao DNA da Gal4p foi da mesma forma substituído experimentalmente pelo domínio de ligação de DNA do repressor LexA de *E. coli* (da resposta SOS; Figura 28-21). Essa proteína quimérica não se liga no UAS_G nem ativa os genes *GAL* de leveduras (como faria a Gal4p intacta) a menos que a sequência UAS_G no DNA seja substituída pelo sítio de reconhecimento de LexA.

A expressão gênica nos organismos eucarióticos pode ser regulada por sinais intercelulares e intracelulares

Os efeitos de hormônios esteroides (e dos hormônios da tireoide e retinoide, que têm modo de ação semelhante) são

FIGURA 28-32 **Ativadores de transcrição.** (a) Ativadores típicos, como CTF1, Gal4p e Sp1, têm um domínio de ligação ao DNA e um domínio de ativação. A natureza do domínio de ativação está indicada por símbolos: — — —, ácido; Q Q Q, rico em glutamina; P P P, rico em prolina. Essas proteínas geralmente ativam a transcrição ao interagirem com complexos coativadores, como o Mediador. Observe que os sítios de ligação ilustrados nessa figura geralmente não são encontrados juntos perto de um único gene. (b) Uma proteína quimérica contendo o domínio de ligação ao DNA de Sp1 e o domínio de ativação de CTF1 ativa a transcrição se uma caixa GC estiver presente.



outros exemplos bem conhecidos da modulação de proteínas regulatórias em organismos eucarióticos pela interação direta com sinais moleculares (ver Figura 12-30). Ao contrário de outros tipos de hormônios, os hormônios esteroides não precisam se ligar a receptores de membrana plasmática. Em vez disso, eles reagem com receptores intracelulares que são fatores de transcrição. Hormônios esteroides (p. ex., estrogênio, progesterona e cortisol) são hidrofóbicos demais para se dissolverem facilmente no sangue, sendo transportados por proteínas carreadoras específicas, que os levam desde o local de onde são liberados até seus tecidos-alvo. Neles, o hormônio passa através da membrana plasmática por difusão simples. Uma vez no interior da célula, os hormônios interagem com um dos dois tipos de receptor nuclear de ligação de esteroides (**Figura 28-33**). Em ambos os casos, o complexo hormônio-receptor atua ligando-se a sequências de DNA altamente específicas, chamadas de **elementos de resposta hormonal (HRE)**, e, desse modo, modifica a expressão gênica. Atuando nesses sítios, os receptores atuam como ativadores de transcrição, recrutando coativadores e a Pol II (junto com seus fatores de transcrição associados) para disparar a transcrição do gene.

As sequências de DNA (HRE) às quais os complexos dos receptores de hormônios se ligam são semelhantes em tamanho e organização para os vários hormônios esteroides, mas possuem sequências diferentes. Cada receptor tem uma sequência-consenso HRE (Tabela 28-4) à qual o complexo hormônio-receptor se liga bem, com cada consenso consistindo em duas sequências de seis nucleotídeos, contíguas ou separadas por três nucleotídeos, em *tandem* ou em arranjo de palíndromo. Os receptores de hormônios têm um domínio de ligação ao DNA altamente conservado com dois dedos de zinco (**Figura 28-34**). O complexo hormônio-receptor se liga ao DNA como um dímero, com os domínios dedo de zinco de cada monômero reconhecendo uma das sequências de seis nucleotídeos. A capacidade de um determinado hormônio agir por meio de um complexo hormônio-receptor para alterar a expressão de um gene específico depende da sequência exata do HRE, da sua posição relativa no gene e do número de HRE associados ao gene.

A região de ligação do ligante da proteína receptora – sempre na extremidade da carboxila – é muito específica

para cada receptor. Por exemplo, na região de ligação ao ligante, o receptor de glicocorticoide tem apenas 30% de semelhança com o receptor de estrogênio e de 17% com o

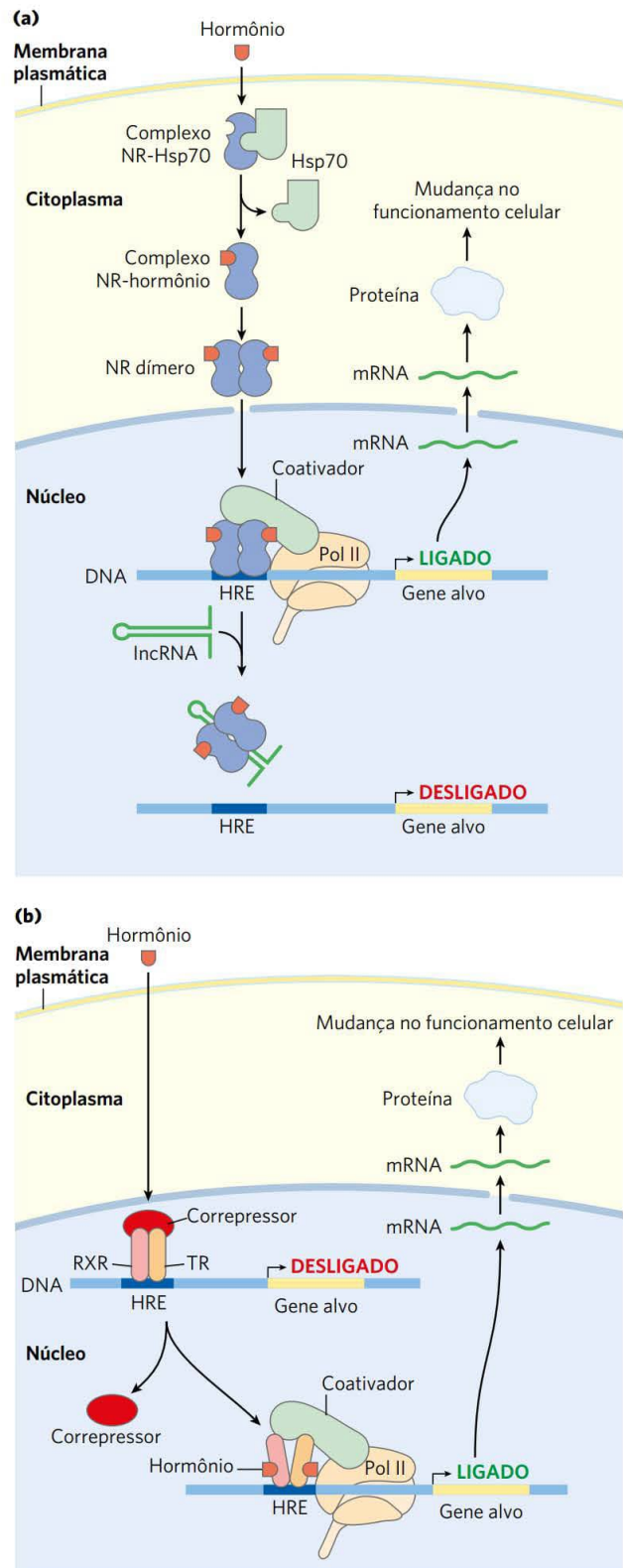


FIGURA 28-33 Mecanismos de funcionamento dos receptores de hormônios esteroides. Há dois tipos de receptores nucleares ligantes de esteroides. **(a)** Os receptores monoméricos tipo I (NR) são encontrados no citoplasma, formando um complexo com a proteína de choque térmico Hsp70. Receptores para estrogênio, progesterona, androgênicos e glicocorticoides são desse tipo. Quando o hormônio esteroide se liga, a Hsp70 se dissocia e o receptor dimeriza, expondo um sinal de localização nuclear. O receptor dimérico, com o hormônio ligado, migra para o núcleo, onde se liga a um elemento de resposta hormonal (HRE) e atua como ativador de transcrição. A atividade do receptor pode ser reprimida pela ligação com um lncRNA (p. ex., GAS5) que compete diretamente com a ligação a HRE. **(b)** Receptores tipo II, ao contrário, estão sempre no núcleo, ligados a um HRE no DNA e a um corressor que os torna inativos. O receptor do hormônio da tireoide (TR) é desse tipo. O hormônio migra pelo citoplasma e se difunde através da membrana nuclear. No núcleo, ele se liga a um heterodímero, constituído pelo receptor do hormônio da tireoide e pelo receptor X de retinoides (RXR). Uma mudança na conformação leva à dissociação do corressor, e o receptor, então, funciona como ativador de transcrição.

TABELA 28-4 Elementos de resposta hormonal (HRE) ligados por receptores de hormônios do tipo esteroide

Receptores	Sequência de ligação consenso de HRE ^a
Androgênio	GG(A/T)ACAN ₂ TGTTCT
Glicocorticoide	GGTACAN ₃ TGTTCT
Ácido retinoico (alguns)	AGGTCAN ₅ AGGTCA
Vitamina D	AGGTCAN ₃ AGGTCA
Hormônio da tireoide	AGGTCAN ₃ AGGTCA
RX ^b	AGGTCANAGGTCANAG GTCANAGGTCA

^aN representa qualquer nucleotídeo.^bForma um dímero com o receptor do ácido retinoico ou com o receptor da vitamina D.

receptor dos hormônios da tireoide. O tamanho da região de ligação do ligante varia drasticamente; no receptor da vitamina D, essa região tem apenas 25 resíduos de aminoácidos, ao passo que no receptor mineralocorticoide ela tem 603 resíduos. Mutações que alteram apenas um resíduo de aminoácido nessas regiões podem resultar em perda da resposta a um hormônio específico. Algumas pessoas que não respondem ao cortisol, à testosterona, à vitamina D ou à tireoxina têm mutações desse tipo.

Os lncRNA adicionam uma outra dimensão na regulação dos receptores de hormônios. Um lncRNA denominado GAS5 (do inglês, *growth arrest specific 5*) inibe a ativação da transcrição pelos receptores de glicocorticoides por competição direta com o DNA pela ligação ao receptor. GAS5 também inibe a atividade dos receptores de androgênio, da progesterona e dos mineralocorticoides, os quais estão in-

timamente relacionados. Além disso, o GAS5 interage com sequências no miRNA, denominadas miR-21, as quais interagem com e inibem a atividade de algumas proteínas regulatórias que agem como supressores de tumor. A expressão de GAS5 está suprimida em uma ampla gama de tumores, levando a um aumento da expressão de hormônios esteroides, níveis mais elevados de miR-21 ativa e uma taxa elevada de crescimento tumoral. Baixos níveis de GAS5, portanto, estão correlacionados com piora na evolução dos pacientes de câncer, tornando esse lncRNA um forte alvo de pesquisas.

Alguns receptores de hormônios, incluindo o receptor de progesterona humano, ativam a transcrição com a ajuda de um lncRNA diferente de aproximadamente 700 nucleotídeos que age como coativador – **ativador de RNA receptor de esteroide (SRA)**. O SRA atua como parte de um complexo ribonucleoproteico, porém é o componente de RNA que é necessário para a coativação da transcrição. O conjunto detalhado das interações entre o SRA e outros componentes dos sistemas regulatórios para esses genes ainda está para ser elucidado.

A regulação pode resultar da fosforilação de fatores de transcrição nuclear

Foi observado, no Capítulo 12, que os efeitos da insulina na expressão gênica são mediados por uma série de etapas, levando, em última análise, à ativação de uma proteína-cinase no núcleo que fosforila proteínas de ligação de DNA específicas, alterando suas capacidades de atuarem como fatores de transcrição (ver Figura 12-19). Esse mecanismo geral controla os efeitos de vários hormônios não esteroides. Por exemplo, a via β -adrenérgica, que leva a níveis elevados de cAMP no citosol, agindo como um segundo mensageiro tanto em organismos eucarióticos como em bactérias (Figura 28-18), também afeta a transcrição de um conjunto de genes, sendo que cada um deles está localizado perto de uma sequência específica de DNA, denominada **elemento de resposta ao cAMP (CRE)**. A subunidade catalítica da proteína-cinase A, liberada quando os níveis de cAMP aumentam (ver Figura 12-6), entra no núcleo e fosforila uma proteína nuclear, a **proteína de ligação ao CRE (CREB)**. Quando fosforilada, a CREB se liga aos CRE perto de certos genes e atua como um fator de transcrição, ligando a expressão desses genes.

Muitos mRNA de eucariotos estão sujeitos à repressão da tradução

A regulação no nível da tradução assume um papel de muito mais destaque em organismos eucarióticos em relação a bactérias e ocorre em uma série de situações celulares. Ao contrário da estreita associação entre transcrição e tradução que há nas bactérias, os transcritos gerados em um núcleo eucariótico devem ser processados e transportados ao citoplasma antes da tradução. Isso pode levar a uma demora significativa no aparecimento de uma proteína. Quando é necessário um aumento rápido na produção de proteínas, um mRNA com tradução reprimida, já presente no citoplasma, pode ser ativado para a tradução sem demora. A regulação da tradução pode desempenhar um papel especialmente importante na regulação de determinados genes muito

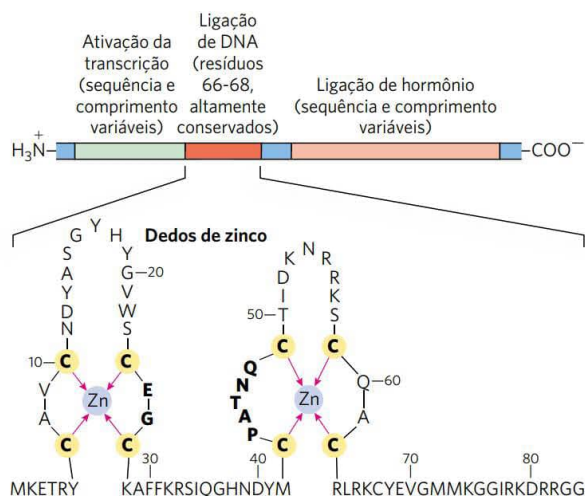


FIGURA 28-34 Receptores típicos de hormônios esteroides. Estas proteínas receptoras têm um sítio de ligação para o hormônio, um domínio de ligação ao DNA e uma região que ativa a transcrição do gene regulado. O domínio altamente conservado de ligação ao DNA tem dois dedos de zinco. A sequência mostrada é a do receptor de estrogênio, mas os resíduos em negrito são comuns a todos os receptores de hormônios esteroides.

longos de eucariotos (alguns são medidos em milhões de pares de bases), para os quais a transcrição e o processamento do mRNA podem durar muitas horas. Alguns genes são regulados tanto nos estágios de transcrição como nos de tradução, com os últimos desempenhando um papel de ajuste fino nos níveis de proteínas celulares. Em algumas células anucleadas, como reticulócitos (eritrócitos imaturos), o controle da transcrição está inteiramente ausente e o controle da tradução dos mRNA armazenados se torna essencial. Como descrito a seguir, os controles na tradução podem também ter um significado espacial durante o desenvolvimento, quando a tradução regulada de mRNA pré-posicionados cria um gradiente local do produto proteico.

Os eucariotos têm pelo menos quatro mecanismos principais de regulação da tradução.

1. Fatores de iniciação da tradução estão sujeitos à fosforilação por proteínas-quinase. Em geral, as formas fosforiladas são menos ativas e provocam uma diminuição geral da tradução na célula.
2. Algumas proteínas se ligam diretamente ao mRNA e atuam como repressores da tradução, muitas se ligando a sítios específicos na região 3' não traduzida (3'UTR). Posicionadas dessa forma, essas proteínas interagem com outros fatores de iniciação de transcrição ligados ao mRNA ou com a subunidade ribossômica 40S para impedir a iniciação da tradução (Figura 28-35).
3. Proteínas de ligação, presentes em eucariotos desde leveduras até mamíferos, interrompem a interação entre eIF4E e eIF4G (ver Figura 27-28). As versões dos mamíferos são conhecidas como 4E-BPs (proteínas de ligação eIF4E). Quando o crescimento celular é lento, essas proteínas limitam a tradução ao se ligarem ao local em eIF4E, que normalmente interage com eIF4G. Quando o crescimento celular é retomado ou aumenta em resposta aos fatores de crescimento ou a outros estímulos, as proteínas de ligação são inativadas pela fosforilação de proteínas dependentes de cinase.

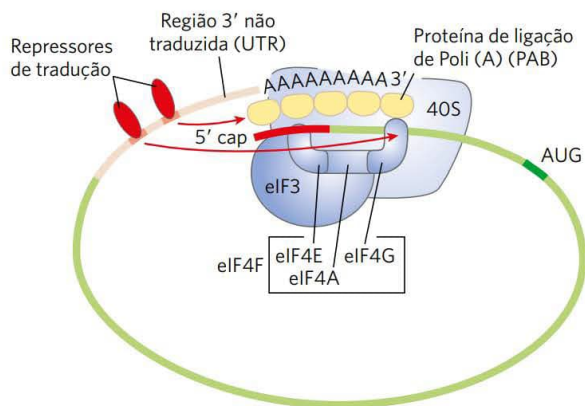


FIGURA 28-35 Regulação da tradução do mRNA eucariótico. Um dos mecanismos mais importantes para a regulação da tradução em eucariotos envolve a ligação de repressores da tradução (proteínas de ligação de RNA) a sítios específicos na região 3' não traduzida (3'UTR) do mRNA. Essas proteínas interagem com os fatores de iniciação eucarióticos ou com o ribossomo para impedir ou tornar mais lenta a tradução.

4. Em geral, a regulação da expressão gênica mediada por RNA ocorre por repressão da tradução.

O grande número de mecanismos de regulação da tradução fornece flexibilidade, permitindo que a repressão se concentre em alguns poucos mRNA ou na regulação global de toda a tradução celular.

A regulação da tradução foi muito bem estudada em reticulócitos. Um dos mecanismos nessas células envolve eIF2, o fator de iniciação que se liga ao tRNA iniciador e o transporta até o ribossomo. Quando Met-tRNA se liga ao sítio P, o fator eIF2B se liga ao eIF2, reciclando-o com a ajuda da ligação e a hidrólise de GTP. A maturação dos reticulócitos inclui a destruição do núcleo celular, resultando em uma membrana plasmática carregando hemoglobina. Os RNA mensageiros depositados no citoplasma antes da perda do núcleo permitem a reposição de hemoglobina. Quando os reticulócitos ficam deficientes em ferro ou grupos heme, a tradução do mRNA da globina é reprimida. Uma proteína-quinase chamada de **repressor controlado por hemina (HCR)** é ativada, catalisando a fosforilação do eIF2. Quando fosforilado, o eIF2 forma um complexo estável com o eIF2B, que sequestra o eIF2, deixando-o indisponível para participar da tradução. Desse modo, o reticulócito coordena a síntese de globina com a disponibilidade de grupos heme.

Muitos outros exemplos de regulação da tradução foram encontrados estudando-se o desenvolvimento de organismos multicelulares, o que será discutido com mais detalhes a seguir.

O silenciamento gênico pós-transcrição é mediado por RNA de interferência

Em eucariotos superiores, incluindo nematódeos, moscas-da-fruta e mamíferos, microRNA (miRNA) mediam o silenciamento de muitos genes. Os RNA funcionam pela interação com mRNA, geralmente na extremidade 3'UTR, levando tanto à degradação do mRNA como à inibição da tradução, fenômeno descrito pela primeira vez por Craig Mello e Andrew Fire. Em qualquer caso, o mRNA e, portanto, o gene que o produz, é silenciado. Essa forma de regulação gênica controla o tempo do desenvolvimento em pelo menos alguns organismos. Ela também é usada como um mecanismo de proteção contra vírus de RNA invasores (particularmente importantes em plantas, que não possuem sistema imune) e para controlar a atividade de transposons. Além disso, moléculas pequenas de RNA desempenham um papel fundamental (ainda indefinido) na formação da heterocromatina.



Craig Mello
[Fonte: cortesia de Craig Mello.]



Andrew Fire
[Fonte: Linda A. Cicero/
Stanford News Service.]

Muitos miRNA estão presentes apenas transitoriamente.

te durante o desenvolvimento, sendo, às vezes, chamados de **pequenos RNA temporais** (**stRNA**, do inglês, *small temporal RNA*). Milhares de miRNA diferentes foram identificados em eucariotos superiores, e eles podem afetar a regulação de um terço dos genes de mamíferos. Eles são transcritos como RNA precursores de cerca de 70 nucleotídeos de comprimento, com sequências complementares internas que formam estruturas em grampo. Detalhes da via de processamento de miRNA foram descritos no Capítulo 26 (ver Figura 26-27). Os precursores são clivados por endonucleases, como Droscha e Dicer, para formar duplexes pequenos de 20 a 25 nucleotídeos. Uma das fitas do miRNA processado é transferida para o mRNA-alvo (ou para o RNA de um vírus ou transposon), levando à inibição da tradução ou à degradação do mRNA (**Figura 28-36**). Alguns miRNA se ligam a um único mRNA, afetando, assim, a expressão de apenas um único gene. Outros interagem com muitos mRNA e, assim, formam o núcleo mecânico dos regulons que coordenam a expressão de muitos genes.

O mecanismo de regulação gênica tem um lado prático interessante e muito útil. Se um pesquisador introduz em um organismo uma molécula de RNA de dupla-fita com sequência correspondendo a praticamente qualquer mRNA, a enzima Dicer cliva o dúplex em segmentos pequenos, denominados **pequenos RNA de interferência** (**siRNA**, do inglês, *small interfering RNA*). Esses RNA pequenos se ligam ao mRNA, silenciando-o (Figura 28-36b). O processo é conhecido como **RNA de interferência** (**RNAi**). Em plantas, praticamente qualquer gene pode ser desligado dessa

maneira. Nematódeos ingerem facilmente RNA funcionais inteiros e, simplesmente, ao introduzirem o RNA dupla-fita na dieta do verme, produz-se uma supressão muito eficiente do gene-alvo. Essa técnica é uma ferramenta importante nos esforços que estão em andamento para estudar funções de genes, pois ela pode interromper a função do gene sem criar um organismo mutante. Esse procedimento também pode ser aplicado a seres humanos. Os siRNA produzidos em laboratório foram usados para bloquear infecções por HIV e vírus da pólio em culturas de células humanas por períodos de cerca de uma semana por vez. O uso amplo de fármacos baseados em RNAi foi inicialmente retardado pelas dificuldades inerentes ao desenvolvimento de moléculas de RNAi apropriadas aos respectivos alvos, devido ao fato de que os tecidos humanos possuem muitas nucleases que degradam RNA. Com os avanços recentes nos métodos de disponibilização, existem, hoje, mais de uma dúzia de fármacos de RNAi em ensaios clínicos avançados para o tratamento de várias doenças, desde a polineuropatia amiloidótica familiar até infecções virais e câncer.

A regulação da expressão gênica mediada por RNA se dá por várias formas nos eucariotos

Os RNA com funções especiais nos eucariotos incluem os miRNA, como descrito anteriormente; os snRNA, envolvidos no *splicing* de RNA (ver Figura 26-16); os snoRNA, envolvidos na modificação de rRNA (ver Figura 26-25); e os lncRNA, encontrados anteriormente neste capítulo. Esses RNA, como todos os RNA (independentemente dos seus comprimentos) que não codificam para proteínas, incluindo rRNA e tRNA, recebem a designação geral de **ncRNAs** (RNA não codificantes, do inglês, *noncoding RNAs*). Os genomas dos mamíferos parecem ter mais ncRNA do que mRNA codificantes. Não surpreende que classes funcionais adicionais de ncRNA ainda estejam sendo descobertas. A seguir, estão apresentados mais alguns exemplos de ncRNA que participam na regulação gênica, os quais são denominados lncRNA quando o comprimento for maior do que 200 nucleotídeos.

O fator de choque térmico 1 (HSF1) é uma proteína ativadora que, em células não estressadas, existe em forma de monômero ligado à chaperona Hsp90. Sob condições de estresse, o HSF1 é liberado da Hsp90 e forma um trímero. O trímero de HSF1 se liga ao DNA e ativa a transcrição de gene que codifica para produtos que são necessários para lidar com o estresse. Um lncRNA, denominado HSR1 (choque térmico de RNA 1; ~ 600 nucleotídeos) estimula a trimerização de HSF1 e a ligação ao DNA. O HSR1 não atua sozinho; ele funciona em um complexo com o fator de alongamento da tradução eEF1A.

Outros RNA afetam a transcrição de várias maneiras. Um lncRNA de 331 nucleotídeos, chamado de 7SK, abundante em mamíferos, liga-se ao fator de alongamento pTEFb da transcrição da Pol II (ver Tabela 26-2) e reprime o alongamento do transcrito. O ncRNA B2 (~ 178 nucleotídeos) se liga diretamente à Pol II durante um choque térmico e reprime a transcrição. A Pol II ligada ao B2 se reúne, formando PIC estáveis, mas a transcrição é bloqueada. O RNA B2, portanto, interrompe a transcrição de vários genes durante o choque térmico; o mecanismo que permite que os genes sensíveis a HSF1 se expressem na presença de B2 ainda não foi desvendado.

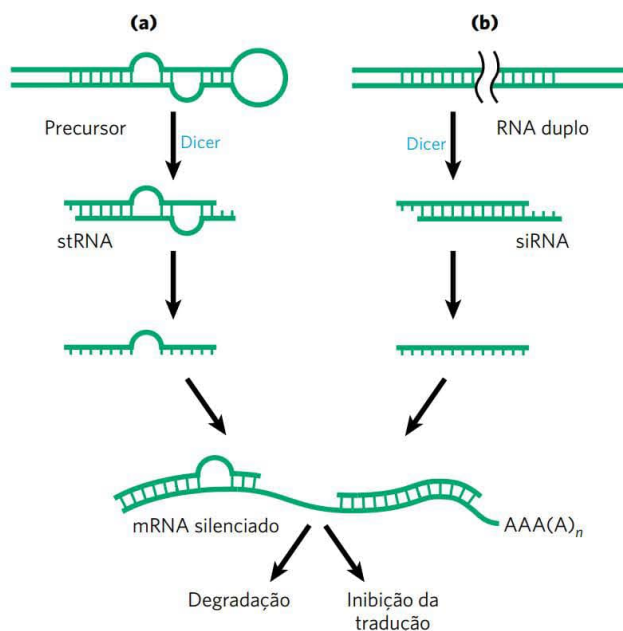


FIGURA 28-36 Silenciamento gênico por RNA de interferência. (a) Os RNA pequenos temporais (stRNA, uma das classes de miRNA) são gerados pela clivagem por Dicer a partir de precursores longos que se dobram, criando regiões de dupla-fita. Os stRNA, então, ligam-se aos mRNA, levando à degradação de mRNA ou à inibição da tradução. (b) Os RNA de dupla-fita podem ser construídos e introduzidos em uma célula. Dicer processa RNA de dupla-fita em pequenos RNA de interferência (siRNA), que interagem com o mRNA-alvo. Mais uma vez, o mRNA é degradado ou a tradução é inibida.

Os conhecimentos sobre os papéis desempenhados por ncRNA na expressão gênica e em muitos outros processos celulares estão se expandindo rapidamente. Ao mesmo tempo, o estudo da bioquímica da regulação gênica está ficando muito menos centrado em proteínas.

O desenvolvimento é controlado por cascatas de proteínas regulatórias

Em virtude de sua enorme complexidade e coordenação intrincadas, os padrões de regulação gênica que levam ao desenvolvimento de um zigoto em animais ou plantas multicelulares não apresentam paralelo. O desenvolvimento precisa de transições na morfologia e na composição de proteínas que dependem de alterações fortemente coordenadas na expressão do genoma. Mais genes são expressos durante o desenvolvimento inicial do que em qualquer outra fase do ciclo de vida. Por exemplo, no ouriço-do-mar, um ovócito tem cerca de 18.500 mRNA diferentes, comparados com os cerca de 6 mil mRNA diferentes nas células de um tecido diferenciado típico. Os mRNA no ovócito dão origem a uma cascata de eventos que regulam a expressão de muitos genes ao longo do tempo e do espaço.

Vários organismos servem como sistemas-modelo importantes para o estudo do desenvolvimento, uma vez que são fáceis de serem mantidos em laboratório e têm tempos de geração relativamente curtos. Eles incluem nematódeos, moscas-da-fruta, peixe-zebra, camundongos e a planta *Arabidopsis*. Essa discussão se concentra no desenvolvimento da mosca-da-fruta. Nossa compreensão dos eventos moleculares durante o desenvolvimento de *Drosophila melanogaster* está bem avançada e pode ser usada para ilustrar padrões e princípios de significado geral.

O ciclo de vida da mosca-da-fruta inclui a metamorfose completa, à medida que passa de embrião para adulto (**Figura 28-37**). Entre as características mais importantes do embrião estão a sua **polaridade** (as partes anteriores e posteriores do animal são prontamente reconhecidas, bem como as partes dorsal e ventral) e a **metameria** (o corpo do embrião é composto por segmentos repetidos em série, cada um deles com traços característicos). Durante o desenvolvimento, esses segmentos se organizam em cabeça, tórax e abdome. Cada segmento do tórax do adulto tem um conjunto diferente de apêndices. O desenvolvimento desse padrão complexo está sob controle genético, e foram descobertos vários genes reguladores de padrões que afetam drasticamente a organização do corpo.

O ovo de *Drosophila*, juntamente com 15 células protetoras, é circundado por uma camada de células foliculares (**Figura 28-38**). À medida que a célula-ovo se forma (antes da fecundação), os mRNA e as proteínas que se originam das células protetoras e foliculares são depositados no interior da célula-ovo, onde alguns deles desempenham um papel crucial para o desenvolvimento. Assim que um óvulo fecundado é posto, o núcleo se divide e os núcleos descendentes continuam a se dividir em sincronia a cada 6 a 10 minutos. Membranas plasmáticas não se formam em torno dos núcleos, distribuídos no interior do citoplasma do ovo (formando um sincício). Entre a oitava e a nona rodadas da divisão nuclear, os núcleos migram para a camada externa do ovo, formando uma monocamada de núcleos envolvendo o citoplasma comum, rico em vitelo; trata-se de uma blastoderme sincicial. Após mais algumas divisões, as invaginações de membrana envolvem os núcleos para criar uma camada de células, que forma uma blastoderme celular. Nesse estágio, os ciclos mitóticos das várias células perdem a sincronia. O destino do

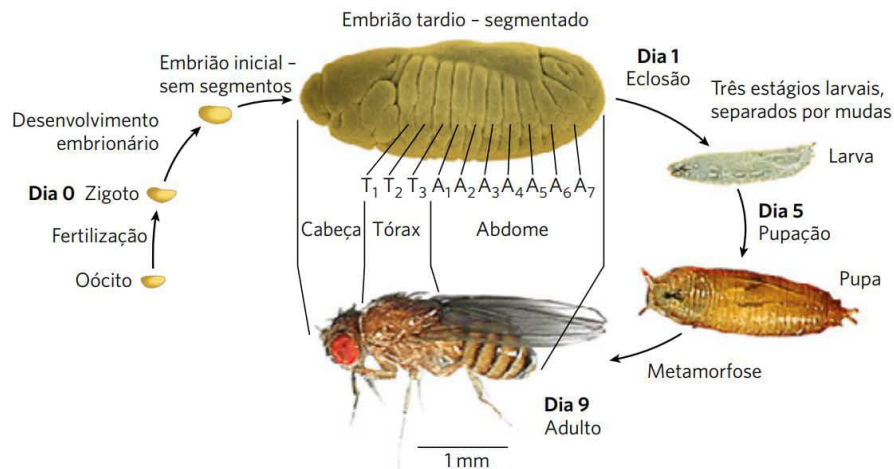


FIGURA 28-37 Ciclo de vida da mosca-da-fruta *Drosophila melanogaster*. A *Drosophila* passa por metamorfose completa, ou seja, a forma do inseto adulto é radicalmente diferente daquela dos seus estágios imaturos, uma transformação que precisa de grandes alterações durante o desenvolvimento. Ao final do estágio embrionário, os segmentos se formaram, e cada um possui estruturas especializadas a partir das quais se desenvolverão os vários apêndices e outras características da mosca adulta. [Fontes: embrião adulto: cortesia de F. R. Turner, Department of Biology, University of Indiana, Bloomington. Outras fotos: cortesia do Prof. Dr. Christian Klambt, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Institut für Neuro- und Verhaltensbiologie.]

FIGURA 28-38 Desenvolvimento inicial em *Drosophila*. Durante o desenvolvimento do ovo, mRNA (incluindo os transcritos dos genes *bicoid* e *nanos*, discutidos no texto) e proteínas maternas são depositados no ovócito em desenvolvimento (célula-ovo não fecundada) por células protetoras e foliculares. Após a fecundação, os dois núcleos do ovo fecundado dividem-se em sincronia no interior do citoplasma comum (sincício), migrando, então, para a periferia. As invaginações de membrana envolvem os núcleos para criar uma monocamada de células na periferia; esse é o estágio de blastoderme celular. Durante as divisões nucleares iniciais, vários núcleos na extremidade posterior se tornam células polo, que, mais tarde, tornam-se células da linhagem germinativa.

desenvolvimento das células é determinado pelos mRNA e pelas proteínas originalmente depositados no ovo pelas células protetoras e foliculares.

As proteínas que, por meio de alterações na concentração local ou na atividade, fazem o tecido circundante adotar um formato ou uma estrutura particular, são algumas vezes chamadas de **morfógenos**; elas são os produtos de genes

reguladores de padrões. Como definido por Christiane Nüsslein-Volhard, Edward B. Lewis e Eric F. Wieschaus, três classes principais de genes reguladores de padrão – genes maternos, de segmentação e homeóticos – funcionam em estágios sucessivos do desenvolvimento para especificar as características básicas do corpo do embrião de *Drosophila*. Os **genes maternos** são expressos no óvulo não fertilizado, e os **mRNA maternos** resultantes permanecem dormentes até a fertilização. Eles fornecem a maioria das proteínas que são necessárias logo no início do desenvolvimento, até que a blastoderme celular esteja formada. Algumas das proteínas codificadas por mRNA maternos direcionam a organização espacial do embrião nos estágios iniciais do desenvolvimento, estabelecendo uma polaridade. Os **genes de segmentação**, transcritos após a fecundação, orientam a formação do número adequado de segmentos corporais. Pelo menos três classes de genes de segmentação atuam em estágios sucessivos: os **genes gap** dividem o embrião em várias regiões mais amplas e os **genes pair-rule**, junto com os **genes da polaridade do segmento**, definem 14 listras que se tornam os 14 segmentos do embrião normal.



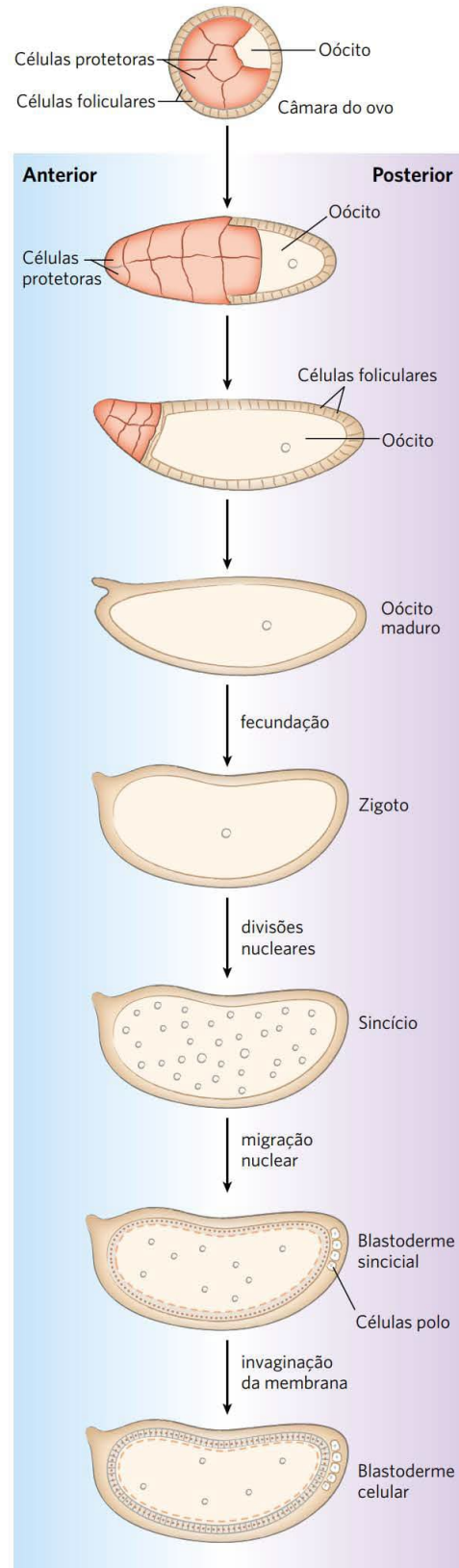
Christiane Nüsslein-Volhard
[Fonte: L'Oréal/Micheline Pelletier.]



Edward B. Lewis, 1918-2004
[Fonte: CalTech Archives, California Institute of Technology.]



Eric F. Wieschaus
[Fonte: cortesia de Eric F. Wieschaus.]



Os **genes homeóticos** são expressos ainda mais tarde; eles especificam quais órgãos e apêndices irão se desenvolver em segmentos corporais específicos.

Os vários genes regulatórios nessas três classes orientam o desenvolvimento da mosca adulta, com cabeça, tórax e abdome, com o número adequado de segmentos e com os apêndices corretos em cada segmento. Embora a embriogênese leve cerca de um dia para se completar, todos esses genes são ativados durante as primeiras quatro horas. Alguns mRNA e proteínas estão presentes por apenas alguns minutos em pontos específicos durante esse período. Alguns dos genes codificam fatores de transcrição que afetam a expressão de outros genes em um tipo de cascata de desenvolvimento. Também ocorre regulação no nível da tradução e muitos dos genes reguladores codificam repressores de tradução, a maioria dos quais se liga à 3'-UTR do mRNA (Figura 28-35). Como muitos mRNA são depositados no ovo muito antes de sua tradução ser necessária, a repressão da tradução fornece uma ampla via especialmente importante para a regulação em vias de desenvolvimento.

Genes maternos Alguns genes maternos são expressos nas células protetoras e nas células do folículo e alguns no próprio ovo. No óvulo não fertilizado de *Drosophila*, os produtos dos genes maternos estabelecem dois eixos – anteroposterior e dorsoventral – e, assim, definem quais regiões do ovo se desenvolverão radialmente simétricas na cabeça e no abdome e nas partes superior e inferior da mosca adulta.

Se todas as células se dividissem para produzir duas células-filhas idênticas, os organismos pluricelulares nunca seriam mais do que uma bola de células idênticas. A produção de células com destinos diferentes necessita de divisões celulares assimétricas programadas. Um evento-chave no desenvolvimento inicial é o estabelecimento de gradientes de RNA e proteínas ao longo dos eixos corporais. Alguns mRNA maternos têm produtos proteicos que se difundem através do citoplasma para criar uma distribuição assimétrica no ovo. Portanto, diferentes células na blastoderme celular herdam diferentes quantidades dessas proteínas, colocando as células em diferentes vias de desenvolvimento. Os produtos dos mRNA maternos incluem ativadores ou repressores de transcrição, bem como repressores de tradução, todos regulando a expressão de outros genes reguladores de padrão. Os padrões e sequências específicos resultantes da expressão gênica diferem, portanto, entre linhagens celulares diferentes e, em última análise, orquestram o desenvolvimento de cada estrutura do adulto.

O eixo anteroposterior em *Drosophila* é definido, pelo menos em parte, pelos produtos dos genes *bicoide* e *nanos*. O produto do gene *bicoide* é um morfógeno anterior importante, e o produto do gene *nanos* é um morfógeno posterior importante. O mRNA do gene *bicoide* é sintetizado pelas células protetoras e depositado no ovo não fertilizado perto do polo anterior. Nüsslein-Volhard descobriu que esse mRNA é traduzido logo após a fecundação, e a proteína bicoide se difunde através da célula para criar,

na sétima divisão nuclear, um gradiente de concentração irradiando a partir do polo anterior (**Figura 28-39a**). A proteína bicoide é um fator de transcrição que ativa a expressão de vários genes de segmentação; ela contém um homeodomínio (p. 1135). A bicoide também é um repressor de tradução que inativa certos mRNA. As quantidades de proteína bicoide em várias partes do embrião afetam a expressão subsequente de outros genes de uma maneira dependente de limiar. Os genes são ativados por transcrição ou reprimidos por tradução apenas onde a concentração de proteína bicoide excede o limite. Mudanças na forma do gradiente de concentração de bicoide apresentam efeitos drásticos no padrão do corpo. A ausência de proteína bicoide resulta no desenvolvimento de um embrião com dois abdômes, mas sem cabeça ou tórax (Figura 28-39b); entretanto, embriões sem bicoide irão se desenvolver normalmente se uma quantidade adequada de mRNA *bicoide* for injetada no ovo na extremidade apropriada. O gene *nanos* tem um papel análogo, mas o seu mRNA é depositado na extremidade posterior do ovo, e o gradiente anteroposterior de proteína atinge seu pico no polo posterior. A proteína nanos é um repressor da tradução.

Um olhar mais amplo aos efeitos dos genes maternos revela o esquema do circuito de desenvolvimento. Além dos mRNA *bicoide* e *nanos*, depositados assimetricamente no ovo, vários outros mRNA maternos são depositados uniformemente no citoplasma do ovo. Três desses mRNA codificam as proteínas pumílio, hunchback e caudal, todas afetadas por *nanos* e *bicoide* (**Figura 28-40**). Caudal e Pumílio estão envolvidas no desenvolvimento da extremidade posterior da mosca. Caudal é uma ativadora da transcrição com um homeodomínio; pumílio é um repressor de tradução. A proteína hunchback desempenha um papel importante no desenvolvimento da extremidade anterior e é um regulador da transcrição de vários genes, em alguns casos um regulador positivo, em outros, negativo. A bicoide suprime a tradução de *caudal* na extremidade anterior e atua como ativador da transcrição de *hunchback* na blastoderme celular. Devido ao fato de que *hunchback* é expressa tanto por mRNA maternos como por genes do ovo em desenvolvimento, ela é considerada tanto um gene materno quanto um gene de segmentação. O resultado das atividades de bicoide é um aumento da concentração de hunchback na extremidade anterior do ovo. As proteínas nanos e pumílio atuam como repressores de tradução de *hunchback*, suprimindo a síntese da sua proteína próxima da extremidade posterior do ovo. Pumílio não funciona na ausência da proteína nanos, e o gradiente da expressão de nanos confina a atividade de ambas as proteínas à região posterior. A repressão da tradução do gene *hunchback* leva à degradação do mRNA de *hunchback* perto da extremidade posterior. Entretanto, a ausência de bicoide na extremidade posterior leva à expressão de *caudal*. Desse modo, as proteínas hunchback e caudal ficam distribuídas assimetricamente no ovo.

Genes de segmentação Genes *gap*, genes *pair-rule* e genes de polaridade de segmentos, três subclasses de genes de segmentação em *Drosophila*, são ativados em estágios su-

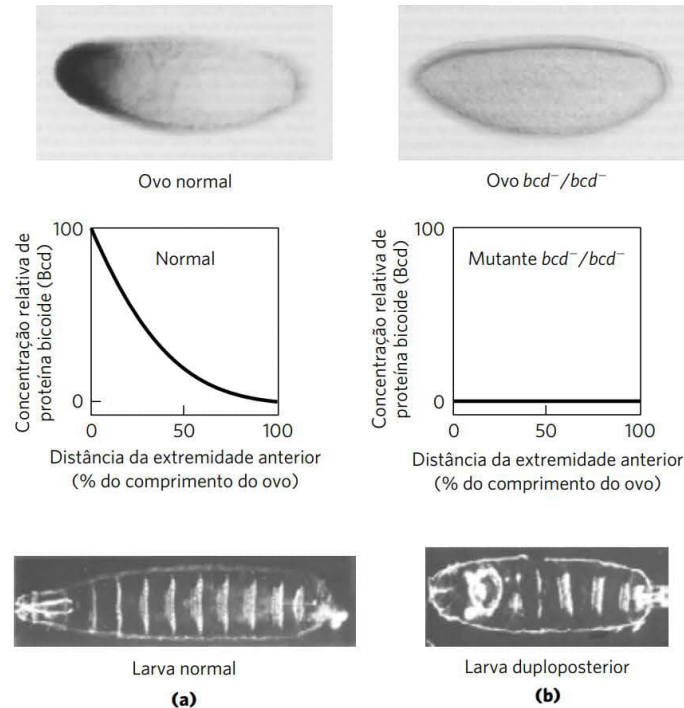
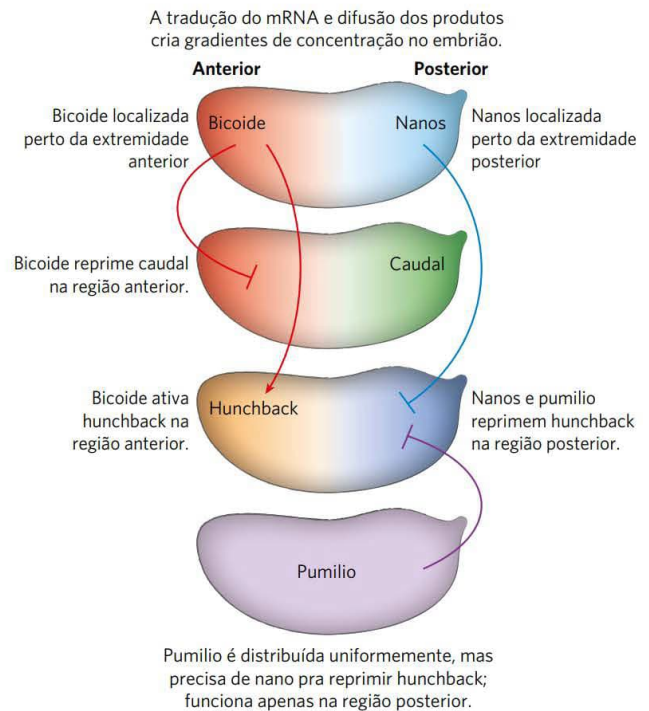


FIGURA 28-39 Distribuição de um produto do gene materno em um ovo de *Drosophila*. (a) Micrografia de um ovo corado imunologicamente (parte superior), mostrando a distribuição do produto do gene *bicoide* (*bcd*). O gráfico mostra a intensidade da coloração ao longo do comprimento do ovo. Essa distribuição é essencial para um desenvolvimento normal das estruturas anteriores da larva (parte inferior). (b) Se o gene *bcd* não for expresso pela mãe (mutante bcd^-/bcd^-) e, portanto, não haverá depósito de mRNA de *bicoide* no ovo, a larva resultante terá dois posteriores (e morre em seguida). [Fonte: republicado, com autorização, de Elsevier, "The bicoid protein determines position in the *Drosophila* embryo in a concentration-dependent manner" por Wolfgang Driever e Christiane Nüsslein-Volhard, *Cell* 54:83-93, julho 1, 1988; permissão intermediada por Copyright Clearance Center, Inc.]

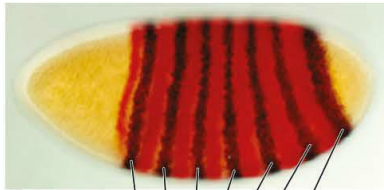
cessivos do desenvolvimento embrionário. A expressão dos genes gap é geralmente regulada pelos produtos de um ou mais genes maternos. Pelo menos alguns dos genes gap codificam fatores de transcrição que afetam a expressão de outros genes de segmentação ou (posteriormente) genes homeóticos.

Um gene de segmentação bem caracterizado é *fushi tarazu* (*ftz*), da subclasse *pair-rule*. Quando *ftz* é deletado, o embrião desenvolve sete segmentos, em vez dos 14 normais, cada segmento com o dobro da largura normal. A proteína Fushi-tarazu (Ftz) é um ativador de transcrição com um homeodomínio. Os mRNA e as proteínas derivadas do gene *ftz* normal se acumulam em um padrão impressionante de sete listras, que envolvem os dois terços posteriores do em-

FIGURA 28-40 Circuitos regulatórios do eixo anteroposterior em um ovo de *Drosophila*. Os mRNA de *bicoide* e *nanos* estão localizados perto dos polos anterior e posterior, respectivamente. Os mRNA de *caudal*, *hunchback* e *pumilio* estão distribuídos uniformemente por todo o citoplasma do ovo. Os gradientes das proteínas bicoide (Bcd) e nanos afetam a expressão dos mRNA de *caudal* e *hunchback*, como mostrado, levando à acumulação da proteína hunchback na região anterior e da proteína caudal na região posterior do ovo. Como a proteína pumilio precisa da proteína nanos para ter atividade como repressor da tradução de *hunchback*, ela funciona apenas na extremidade posterior.



(a) Visão lateral



(b) Visão dorsal de corte transversal

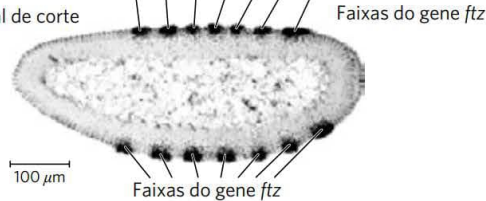


FIGURA 28-41 Distribuição do produto do gene *fushi-tarazu* (*ftz*) em embriões iniciais de *Drosophila*. (a) Empregando-se uma metodologia de marcação gene-específica, o produto gênico pode ser detectado em sete bandas em torno da circunferência do embrião. (b) Essas bandas aparecem como pontos escuros (gerados por marcação radioativa) em uma autorradiografia de uma secção transversal e demarcam os limites anteriores dos segmentos que aparecerão mais tarde no embrião. [Fontes: (a) cortesia de Stephen J. Small, Department of Biology, New York University. (b) Cortesia de Phillip Ingham, Imperial College London.]

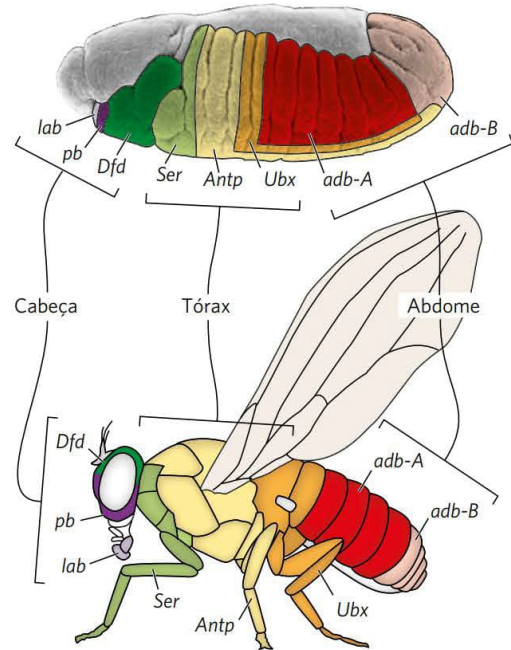
brão (**Figura 28-41**). As listras demarcam as posições de segmentos que se desenvolvem mais tarde; esses segmentos são eliminados se o funcionamento da *ftz* for perdido. A proteína Ftz e algumas poucas proteínas regulatórias similares regulam direta ou indiretamente a expressão de muitos genes na cascata de desenvolvimento contínua.

Genes homeóticos Um conjunto de 8 a 11 genes homeóticos dirige a formação de estruturas particulares em locais específicos no plano do corpo. Esses genes são mais comumente denominados **genes *Hox***, termo derivado de “homeobox”, a sequência conservada de um gene que codifica para um homeodomínio que está presente em todos esses genes. Apesar do nome, essas não são as únicas proteínas relacionadas ao desenvolvimento que incluem um homeodomínio (p. ex., o produto do gene *bicoide* descrito acima tem um homeodomínio), e “*Hox*” é mais uma classificação funcional do que estrutural. Os genes *Hox* estão organizados em grupos genômicos. *Drosophila* tem um desses grupos, e os mamíferos têm quatro (**Figura 28-42**). Os genes nesses grupos são notavelmente semelhantes desde nematódeos até os seres humanos. Em *Drosophila*, cada um dos genes *Hox* é expresso em um segmento particular do embrião e controla o desenvolvimento da parte correspondente da mosca adulta. A terminologia usada para descrever os genes *Hox* pode ser confusa. Eles têm nomes históricos na mosca-da-fruta (p. ex., *ultrabithorax*), ao passo que em mamíferos são designados por dois sistemas concorrentes com base em grupos de letras (A, B, C, D) ou números (1, 2, 3, 4).

Todos os genes que promovem os diferentes estágios do desenvolvimento devem ser reprimidos depois que as suas funções se completam. A expressão dos genes *Hox* é suprimida por dois complexos, PRC1 e PRC2 (complexos de repressão policombinados). PRC1 liga a histona H2A à ubi-

quitina e PRC2 metila a Lys²⁷ da histona H3. Essas modificações levam a mudanças na estrutura da cromatina, que levam à diminuição nos níveis de transcrição. Certos lncRNA desempenham um papel em direcionar PRC1 e PRC2 para regiões do cromossomo onde o silenciamento de genes é necessário. Defeitos em PRC1 ou em PRC2 podem levar a um crescimento celular descontrolado, e a função de um ou de ambos os complexos geralmente está perturbada em células tumorais.

(a)



(b)

Drosophila

HOM-C lab pb Dfd Ser Antp Ubx adb-A adb-B

Humano

Hox-A A1 A2 A3 A4 A5 A6 A7 A9 A10 A11 A13
Hox-B B1 B2 B3 B4 B5 B6 B7 B8 B9
Hox-C C4 C5 C6 C8 C9 C10 C11 C12 C13
Hox-D D1 D3 D4 D8 D9 D10 D11 D12 D13

FIGURA 28-42 Os grupos de genes *Hox* e seus efeitos no desenvolvimento. (a) Cada gene *Hox* na mosca-da-fruta é responsável pelo desenvolvimento de estruturas em uma parte definida do corpo e é expresso em regiões definidas do embrião, como mostrado com códigos de cores. (b) *Drosophila* tem um grupo de genes *Hox* e o genoma humano tem quatro. Muitos desses genes são altamente conservados em animais multicelulares. Relações evolutivas, indicadas por alinhamento de sequência entre o grupo de genes *Hox* da mosca-da-fruta e os grupos de genes *Hox* em mamíferos, são mostradas por linhas tracejadas. Relações semelhantes entre quatro conjuntos de genes *Hox* de mamíferos estão indicadas por alinhamento vertical. [Fonte: (a) F. R. Turner, University of Indiana, Department of Biology.]

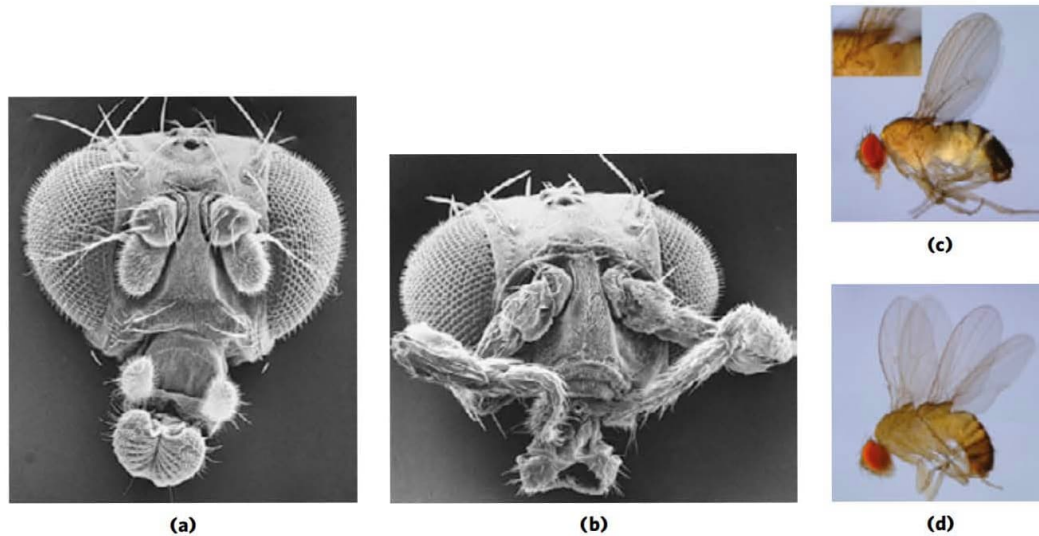


FIGURA 28-43 Efeitos de mutações nos genes *Hox* em *Drosophila*. (a) Cabeça normal. (b) Mutante homeótico (*antennapedia*) no qual as antenas são substituídas por patas. (c) Estrutura corporal normal. (d) Mutante homeótico (*bithorax*) em que um segmento se desenvolveu incorretamente e formou um conjunto extra de asas. [Fontes: (a, b) F. R. Turner, University of Indiana, Department of Biology. (c, d) Cortesia de Nipam Patel, Patel Lab, Berkeley, California.]

A perda dos genes *Hox* em moscas-da-fruta por mutação ou deleção provoca o aparecimento de um apêndice normal ou de uma estrutura corporal em uma posição corporal inadequada. Um exemplo importante é o gene *ultrabithorax* (*ubx*). Quando o funcionamento de *Ubx* é perdido, o primeiro segmento abdominal desenvolve-se incorretamente, tendo a estrutura do terceiro segmento torácico. Outras mutações homeóticas conhecidas provocam a formação de um conjunto extra de asas, ou duas patas na posição da cabeça, em que normalmente existem antenas (**Figura 28-43**). Em geral, os genes *Hox* abrangem longas regiões do DNA. O gene *ubx*, por exemplo, tem 77 mil pares de bases de comprimento. Mais de 73 mil pares de bases desse gene são íntrons, um dos quais tem mais de 50 mil pares de bases de comprimento. A transcrição do gene *ubx* leva aproximadamente uma hora. Imagina-se que o atraso que isso impõe à expressão gênica de *ubx* seja um mecanismo para marcar o tempo envolvido na regulação temporal das etapas seguintes do desenvolvimento. Muitos genes *Hox* são regulados adicionalmente por miRNA codificados por regiões intergênicas de grupos de genes *Hox*. Todos os produtos de genes *Hox* são, em si, fatores de transcrição que regulam a expressão de uma série de genes situados a jusante.

Muitos dos princípios de desenvolvimento destacados anteriormente se aplicam a outros eucariotos, desde nematódeos até o ser humano. Algumas das proteínas reguladoras são conservadas. Por exemplo, os produtos dos genes que contêm homeobox *HOXA7* em camundongos e *antennapedia* em moscas-da-fruta diferem em apenas um resíduo de aminoácido. É evidente que, embora os mecanismos regulatórios moleculares possam ser semelhantes, muitos dos eventos finais do desenvolvimento não são conservados (os seres humanos não têm asas ou antenas). A diferença

nos resultados deve-se a diferenças nos genes-alvo a jusante, controlados pelos genes *Hox*. A descoberta de determinantes estruturais com funções moleculares identificáveis é a primeira etapa para compreender os eventos moleculares básicos do desenvolvimento. À medida que mais genes e seus produtos proteicos forem descobertos, o lado bioquímico deste vasto quebra-cabeça será elucidado com maior riqueza de detalhes.

Células-tronco têm um potencial de desenvolvimento que pode ser controlado

Se compreendermos o desenvolvimento, e os mecanismos da regulação gênica que o governam, será possível controlá-lo. Um ser humano adulto tem muitos tipos de tecidos diferentes. Muitas células se diferenciam definitivamente e não se dividem mais. Caso um órgão não funcione direito devido a doença ou a um membro que foi perdido em um acidente, os tecidos não são repostos imediatamente. Muitas células não são reprogramadas com facilidade, devido aos processos regulatórios que ocorrem ou mesmo devido à perda de uma parte ou de todo o DNA genômico. A medicina possibilitou a realização de transplantes, mas os doadores de órgãos são uma fonte limitada e a rejeição de órgãos continua sendo um problema médico de maior importância. Caso os seres humanos pudessem regenerar os seus órgãos, membros ou tecido nervoso, a rejeição deixaria de ser um problema. A cura da insuficiência renal ou de doenças neurodegenerativas poderia vir a ser uma realidade.

A chave para a regeneração de tecidos se encontra nas **células-tronco** – células que mantêm a capacidade de se diferenciar em vários tecidos. Nos seres humanos, depois que um óvulo é fecundado, as primeiras divisões celulares criam uma bola de células **totipotentes** (a mórula), célu-

las com a capacidade de se diferenciarem individualmente em qualquer tecido ou mesmo em um organismo completo (**Figura 28-44**). A continuação das divisões celulares forma uma esfera oca, o blastocisto. As células mais externas do blastocisto acabam formando a placenta. As camadas mais internas formam as camadas germinativas do feto em desenvolvimento – ectoderma, mesoderma e endoderma. Essas células são **pluripotentes**: originam células de todas as três camadas germinativas e se diferenciam em muitos tipos de tecidos. No entanto, elas não se diferenciam em um organismo completo. Algumas dessas células são **unipotentes**: desenvolvem-se em apenas um tipo de célula e/ou tecido. São as células multipotentes do blastocisto, as **células-tronco embrionárias**, que são usadas atualmente na pesquisa sobre células-tronco embrionárias.

As células-tronco têm duas funções: repor a si mesmas e, ao mesmo tempo, fornecer células que podem se diferenciar. Essas tarefas são realizadas de muitas maneiras (**Figura 28-45a**). Todas ou parte das células-tronco embrionárias podem, em princípio, ter envolvimento na reposição ou na diferenciação, ou mesmo em ambas.

Outros tipos de células-tronco têm o potencial de uso médico. No organismo adulto, as **células-tronco adultas**, uma vez que são produto de diferenciação maior, têm um potencial mais limitado de novo desenvolvimento do que as células-tronco embrionárias. Por exemplo, as células-tronco hematopoiéticas da medula óssea podem dar origem a muitos tipos de células sanguíneas e a células com a capacidade de regenerar ossos. Elas são chamadas de **multipotentes**. Entretanto, essas células não podem se diferenciar em fígado, rim ou neurônio. Em geral, diz-se que as células-tronco adultas têm um **nicho**, microambiente que promove a manutenção da célula-tronco, ao passo que, ao mesmo tempo, permite a diferenciação de algumas células-filhas como substitutas das células no tecido em que atuam (**Figura 28-45b**). As células-tronco hematopoiéticas na medula óssea ocupam um nicho em que a sinalização de células vizinhas e outros fatores mantêm a linhagem de células-tronco. Ao mesmo tempo, algumas células-filhas se diferenciam para fornecer as células sanguíneas necessárias. Compreender o nicho em que as células-tronco operam e os sinais que ele dá é essencial nos esforços para aproveitar o potencial das células-tronco para regenerar tecidos.

Todas as células-tronco apresentam problemas para a aplicação em medicina humana. As células-tronco adultas têm uma capacidade limitada de regenerar tecidos, estão presentes geralmente em número pequeno e são difíceis de ser isoladas de uma pessoa adulta. As células-tronco embrionárias têm um potencial de diferenciação muito maior e

podem ser cultivadas em grande número, porém o seu uso envolve preocupações éticas relacionadas com o fato de ser necessário destruir embriões humanos. A identificação de uma fonte de células-tronco abundante e clinicamente útil, que não suscite preocupações, permanece um objetivo central da pesquisa médica.

A capacidade para manter células-tronco em cultura (i.e., mantê-las em estado indiferenciado) e manipulá-las para que cresçam e se diferenciem em tecidos específicos resulta, em grande parte, da compreensão da biologia do desenvolvimento. A identificação e a manutenção em cultu-

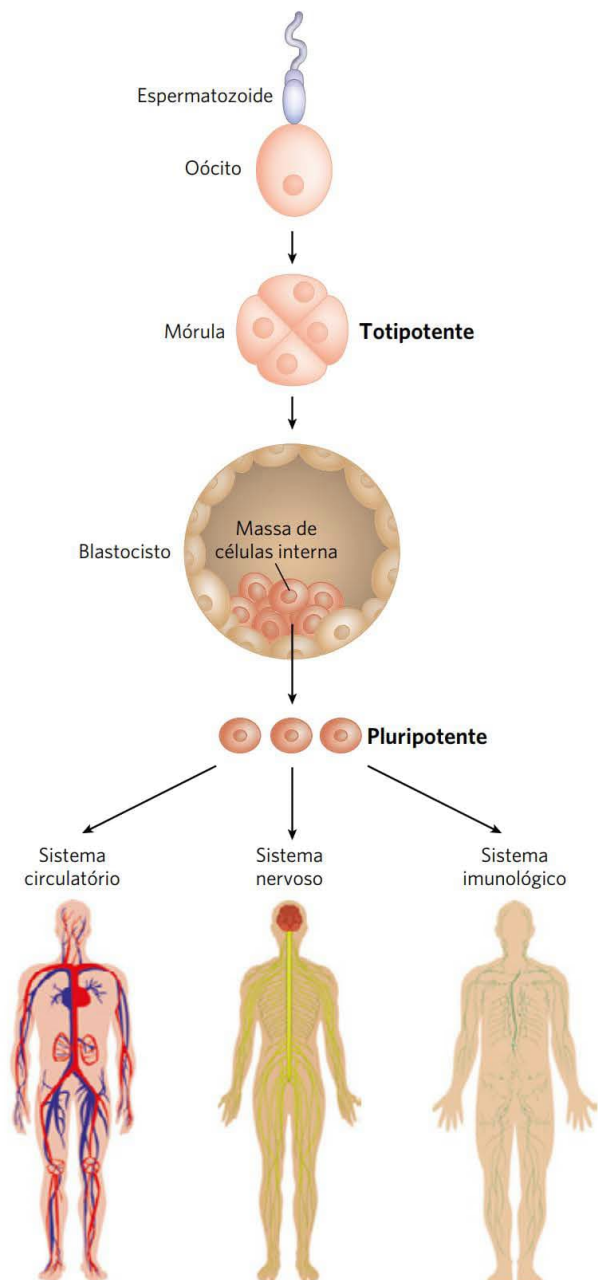


FIGURA 28-44 Células-tronco totipotentes e pluripotentes. As células do estágio de mórula são totipotentes e têm a capacidade de se diferenciar em um organismo completo. A fonte de células-tronco embrionárias pluripotentes é a totalidade das células internas do blastocisto. As células pluripotentes dão origem a vários tipos de tecidos, mas não formam organismos completos.

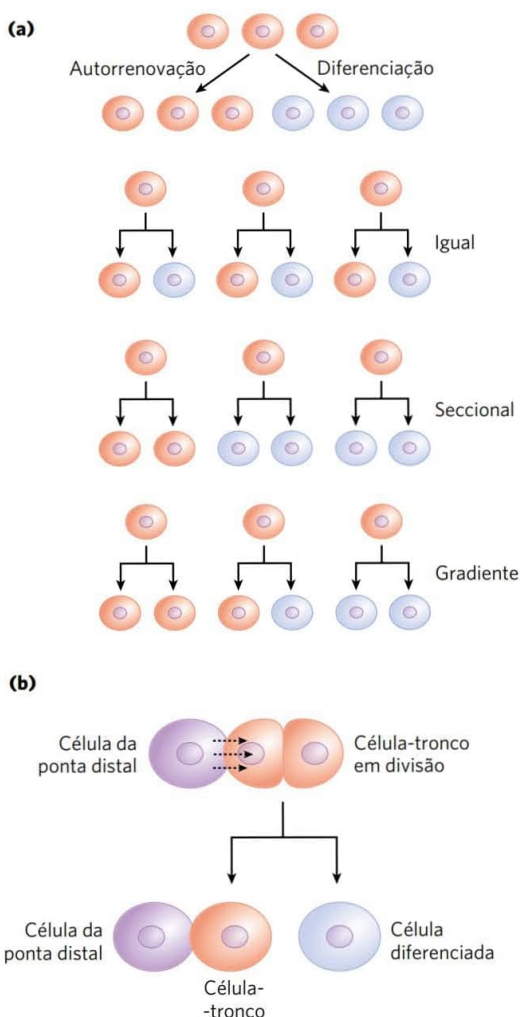


FIGURA 28-45 Proliferação de células-tronco versus diferenciação e desenvolvimento. As células-tronco devem encontrar um equilíbrio entre autorrenovação e diferenciação. **(a)** Alguns padrões possíveis de divisão celular que permitem o reabastecimento de células-tronco e a produção de algumas células diferenciadas. Cada célula pode produzir uma célula-tronco e uma célula diferenciada, duas células diferenciadas ou duas células-tronco em partes específicas do tecido ou da cultura. Ou pode ser estabelecido um gradiente de condições de crescimento, com os destinos das células diferindo de uma extremidade do gradiente para a outra. **(b)** Estabelecendo um nicho de desenvolvimento pelo contato de células-tronco com uma célula ou grupo de células. Sinais moleculares fornecidos pelas células de nicho (neste caso, para plantas, uma célula da extremidade distal) ajudam a orientar o fuso mitótico para a divisão das células-tronco e asseguram que uma célula-filha retenha as propriedades de célula-tronco.

ra de células-tronco pluripotentes de blastocistos humanos foram relatadas por James Thomson e colaboradores em 1998. Esse avanço levou à disponibilidade de longo prazo de linhagens celulares consagradas para pesquisa.

Até agora, células-tronco embrionárias humanas e murinas foram usadas para a maior parte das pesquisas. Embora ambos os tipos de células-tronco sejam pluripo-



James Thomson
[Fonte: cortesia de James Thomson.]

tentes, eles precisam de condições de cultura muito diferentes, otimizadas para permitir a divisão celular indefinidamente sem que haja diferenciação. As células-tronco embrionárias de camundongos crescem em uma camada de gelatina e precisam da presença de um fator de inibição de leucemia (LIF). As células-tronco embrionárias humanas crescem em uma camada de alimentação de fibroblastos embrionários de camundongo e precisam do fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF ou FGF2). O uso de uma camada de alimentação implica que as células de camundongo estejam fornecendo um produto difusível ou algum sinal de superfície, ainda desconhecido, que é necessário para a divisão celular ou para impedir a diferenciação de células-tronco humanas.

Um avanço significativo, registrado em 2007, foi o sucesso em reverter a diferenciação. De fato, células da pele – primeiro de camundongos, depois de seres humanos – foram reprogramadas para assumir as características de células-tronco pluripotentes. Com reprogramação e manipulações, as células expressam pelo menos quatro fatores de transcrição (Oct4, Sox2, Nanog e Lin28), todos conhecidos por ajudarem a manter o estado de célula-tronco. Avanços graduais nessa tecnologia podem tornar desnecessário o cultivo de células-tronco embrionárias e fornecer uma fonte de células-tronco geneticamente adequada a um paciente prospectivo.

Essa discussão sobre a regulação do desenvolvimento e de células-tronco fechou um ciclo que volta ao início da bioquímica. A evolução fornece apropriadamente a primeira e a última palavra deste livro. Caso a evolução leve à geração do tipo de alterações que tornem um organismo em uma outra espécie, o que deve estar alterado é a programação do desenvolvimento. Os processos de desenvolvimento e evolutivos estão intimamente associados, um dando informações ao outro (Quadro 28-1). O estudo contínuo da bioquímica tem tudo a ver com o engrandecimento do futuro da humanidade e a compreensão de nossas origens.

RESUMO 28.3 Regulação da expressão gênica em eucariotos

- Em eucariotos, a regulação positiva é mais comum do que a regulação negativa, e a transcrição é acompanhada por grandes alterações na estrutura da cromatina.
- Em geral, promotores para a Pol II têm uma caixa TATA e sequência Inr, bem como múltiplos sítios de ligação para ativadores de transcrição. Estes últimos, algumas vezes localizados centenas ou milhares de pares de bases distantes da caixa TATA, são chamados de sequências ativadoras a montante em leveduras e potenciadores em eucariotos superiores.

QUADRO 28-1 Sobre barbatanas, asas, picos e outras coisas

A América do Sul tem várias espécies de tentilhões que se alimentam de sementes, comumente chamados de tizius (e, em algumas regiões, de tizirro, alfaiate, papa-arroz, saltador, veludinho). Há cerca de 3 milhões de anos, um pequeno grupo de tizius, de uma única espécie, alçou voo da costa continental, no Pacífico. Talvez levados por uma tempestade, eles perderam de vista a terra e viajaram aproximadamente 1.000 km mar adentro. Pequenos pássaros como esses teriam morrido nessa jornada, mas uma chance ínfima levou esse grupo a uma ilha vulcânica recentemente formada em um arquipélago mais tarde conhecido como Ilhas Galápagos. Essa ilha era um cenário virgem, com plantas e insetos inexplorados como fontes de alimento, e os tentilhões recém-chegados sobreviveram. Ao longo dos anos, novas ilhas se formaram e foram colonizadas por novas plantas e insetos – e pelos tentilhões. Os pássaros exploraram os novos recursos nas ilhas e grupos de pássaros gradualmente se especializaram e divergiram em novas espécies. Quando Charles Darwin pisou nas ilhas, em 1835, havia muitas espécies diferentes de tentilhões nas várias ilhas do arquipélago, alimentando-se de sementes, frutos, insetos, pólen ou mesmo sangue.

A diversidade de criaturas vivas sempre foi uma fonte de admiração para o homem muito antes de os cientistas procurarem entender suas origens. A visão extraordinária transmitida por Darwin, inspirada em parte por seu encontro com os tentilhões das Ilhas Galápagos, deu uma explicação ampla para a existência de organismos com diversidade nas aparências e nas características. Ela também deu origem a muitas questões acerca dos mecanismos envolvidos na evolução. Respostas àquelas questões começaram a aparecer, primeiro pelo estudo dos genomas e do metabolismo de ácidos nucleicos na última metade do século XX e, mais recentemente, por meio de uma nova área do conhecimento, apelidada de evo-devo – mistura da biologia evolutiva e da biologia do desenvolvimento.

Na sua síntese moderna, a teoria da evolução apresenta dois elementos principais: mutações em uma população geram diversidade genética; a seleção natural, então, atua nessa diversidade para favorecer os indivíduos com feramentas genômicas mais úteis e desfavorecer outros. As mutações ocorrem com frequências significativas nos genomas de cada ser vivo, em cada uma das células (ver Se-

ção 8.3). Mutações vantajosas em organismos unicelulares ou na linhagem germinativa de organismos multicelulares podem ser herdadas (i.e., passadas para um número maior da sua prole) se elas conferirem alguma vantagem. Esse é um esquema simples. Muitos se perguntaram, porém, se isso é suficiente para explicar, por exemplo, os muitos tipos de bicos diferentes dos tentilhões das Ilhas Galápagos, ou a diversidade de tamanho e forma entre os mamíferos. Até poucas décadas atrás, haviam várias hipóteses amplamente aceitas a respeito do processo evolutivo: que muitas mutações e novos genes seriam necessários para dar origem a uma nova estrutura física; que organismos mais complexos teriam genomas maiores, e que espécies muito diferentes teriam poucos genes em comum. Todas essas hipóteses estavam erradas.

A genômica moderna revelou que o genoma humano contém menos genes do que se esperava, não são muitos a mais do que o genoma da mosca-da-fruta, e menos do que os genomas de alguns anfíbios. Os genomas de todos os mamíferos, de camundongos a seres humanos, são surpreendentemente semelhantes em número, tipo e arranjo cromossômico dos genes. Enquanto isso, a evo-devo está nos informando como criaturas complexas e muito diferentes podem evoluir a partir dessas realidades genômicas.

Os tipos de organismos mutantes mostrados na Figura 28-43 foram estudados pelo biólogo inglês William Bateson no final do século XIX. Bateson usou as informações que tinha para desafiar a noção darwinista de que as alterações evolutivas teriam de ser graduais. Estudos recentes acerca de genes que controlam o desenvolvimento de organismos colocaram um ponto de exclamação nas ideias de Bateson. Mudanças sutis nos padrões regulatórios durante o desenvolvimento, refletindo apenas uma ou poucas mutações, podem resultar em mudanças físicas assustadoras, possibilitando uma evolução surpreendentemente rápida.

Os tentilhões das Ilhas Galápagos dão um exemplo maravilhoso da ligação entre evolução e desenvolvimento. Há pelo menos 14 (alguns especialistas listam 15) espécies de tentilhões das Ilhas Galápagos, diferenciadas em grande parte pela estrutura do bico. Os tentilhões do solo, por exemplo, têm bicos largos e fortes, adaptados para triturar sementes duras e grandes. Os tentilhões dos cactos têm bicos mais finos e longos, ideais para aces-

■ Grandes complexos de proteínas geralmente são necessários para regular a atividade de transcrição. Os efeitos dos ativadores de transcrição na Pol II são mediados pelos complexos de proteínas coativadoras, como Mediador. As estruturas modulares dos ativadores têm ativação e domínios de ligação do DNA distintos. Outros complexos proteicos, incluindo histonas acetiltransferases e complexos dependentes de ATP, como SWI/SNF e NURF, remodelam reversivamente e modificam a estrutura da cromatina.

■ Os hormônios afetam a regulação da expressão gênica em uma de duas maneiras. Os hormônios esteroides interagem diretamente com receptores intracelulares que são proteínas regulatórias que se ligam ao DNA; a ligação do hormônio pode ter efeitos tanto positivos quanto negativos sobre a transcrição dos genes-alvo. Os hormônios não esteroides se ligam a receptores na superfície das células, disparando uma via de sinalização que pode levar à fosforilação de uma proteína regulatória, afetando sua atividade.

sar os frutos e as flores dos cactos (Figura Q-1). Clifford Tabin e colaboradores investigaram extensamente um conjunto de genes expresso durante o desenvolvimento craniofacial de aves. Eles identificaram um único gene, *Bmp4*, cujo nível de expressão se correlacionava com a formação dos bicos mais robustos dos tentilhões de solo. Bicos mais robustos também se formaram em embriões de galinhas quando altos níveis de *Bmp4* foram artificialmente expressos nos tecidos apropriados, confirmando a importância de *Bmp4*. Em um estudo semelhante, a formação de bicos longos e finos estava ligada à expressão de calmodulina (ver Figura 12-12) em tecidos específicos em estágios de desenvolvimento apropriados. Assim, mudanças importantes na forma e na função do bico podem ser produzidas por alterações sutis na expressão de apenas dois genes envolvidos na regulação do desenvolvimento. Muito poucas mutações são necessárias, e as que ocorrem afetam a regulação. Novos genes *não* são necessários.

O sistema de genes regulatórios que guia o desenvolvimento é surpreendentemente conservado em todos os vertebrados. A expressão elevada de *Bmp4* no tecido adequado, no período certo, leva ao desenvolvimento de partes da mandíbula mais robustas no peixe-zebra. O mesmo gene desempenha um papel essencial no desen-

volvimento dos dentes de mamíferos. O desenvolvimento dos olhos é desencadeado pela expressão de um único gene, *Pax6*, tanto em mosca-da-fruta como em mamíferos. O gene *Pax6* de camundongos desencadeia o desenvolvimento de olhos de mosca-da-fruta nesses insetos, e o gene *Pax6* da mosca-da-fruta desencadeia o desenvolvimento de olhos de camundongo nesses roedores. Em cada organismo, esses genes são parte de uma cascata regulatória muito maior, que, em última análise, cria as estruturas corretas nos locais corretos em cada organismo. A cascata é antiga; por exemplo, os genes *Hox* (descritos no texto) têm sido parte do programa de desenvolvimento de eucariotos pluricelulares por mais de 500 milhões de anos. Mudanças sutis nessa cascata podem ter grandes efeitos no desenvolvimento e, portanto, na aparência final do organismo. Essas mesmas mudanças sutis podem alimentar uma evolução surpreendentemente rápida. Por exemplo, as 400 a 500 espécies descritas de ciclídeos (peixes com nadadeiras com espinhos) no Lago Malawi e no Lago Vitória, no continente africano, são todas derivadas de uma ou poucas populações que colonizaram cada um dos lagos nos últimos 100.000 a 200.000 anos. Os tentilhões das Ilhas Galápagos simplesmente seguiram o caminho de evolução e mudança que os seres vivos têm trilhado há bilhões de anos.

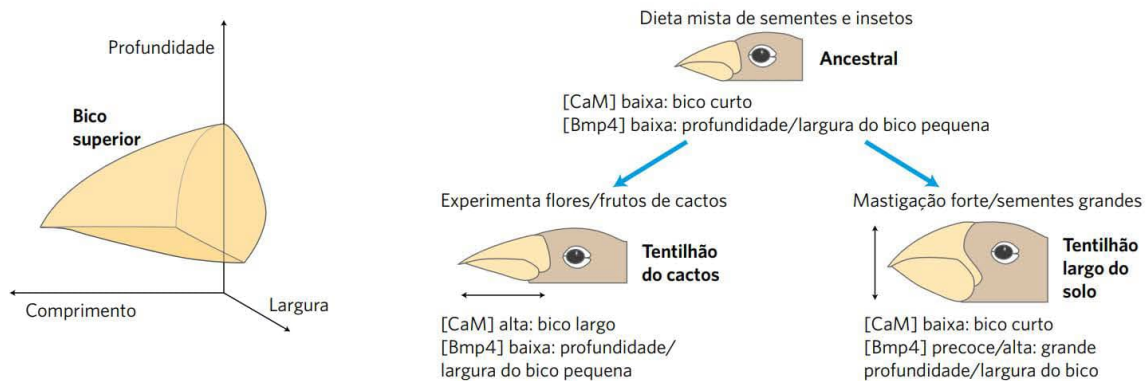


FIGURA Q-1 Evolução de novas estruturas do bico para explorar novas fontes de alimento. Nos tentilhões das Ilhas Galápagos, as diferentes estruturas dos bicos do tentilhão de cactus e tentilhão grande do solo, que se alimentam de diferentes fontes de alimentos, desenvolveram-se, em grande parte, devido a poucas mutações que alteram o momento e o nível de expressão de apenas dois genes: aqueles que codificam para calmodulina (CaM) e *Bmp4*. [Fonte: informações de A. Abzhanov et al., *Nature* 442:563, 2006, Figura 4.]

- A regulação mediada por ncRNA desempenha um papel importante na expressão gênica de organismos eucarióticos, com uma ampla gama de mecanismos que inclui interações com proteínas, mRNA e outros ncRNA.
- O desenvolvimento de um organismo multicelular apresenta um desafio regulatório mais complexo. O destino das células no embrião em estágios iniciais é determinado pelos gradientes de proteínas antero-posterior e dorsoventral que atuam como ativadores de

transcrição ou repressores de tradução, regulando os genes necessários para o desenvolvimento de estruturas apropriadas a uma parte específica do organismo. Conjuntos de genes regulatórios operam em sucessão temporal e espacial, transformando determinadas áreas de uma célula-ovo em estruturas previsíveis no organismo adulto.

- A diferenciação de células-tronco em tecidos funcionais pode ser controlada por sinais e condições extracelulares.

Termos-chave

Termos em negrito estão definidos no glossário.

genes constitutivos 1128	INO80 1148
indução 1128	acetiltransferases de histona (HAT) 1148
repressão 1128	potencializadores 1151
fator de especificidade 1129	sequências ativadoras a montante (UAS) 1151
repressor 1129	ativadores de transcrição 1151
ativador 1129	coativadores 1151
RNA não codificante longo (lncRNA) 1129	fatores de transcrição basais 1151
operador 1129	grupo de alta mobilidade (HMG) 1152
regulação negativa 1129	Mediador 1152
regulação positiva 1130	proteína de ligação à TATA (TBP) 1152
regulador arquitetônico 1130	complexo de pré-iniciação (PIC) 1152
óperon 1131	elementos de resposta hormonal (HRE) 1156
hélice-volta-hélice 1134	RNA de interferência (RNAi) 1159
dedo de zinco 1135	ncRNA 1159
homeodomínio 1135	polaridade 1160
homeobox 1135	metameria 1160
motivo de reconhecimento de RNA (RRM) 1135	genes maternos 1161
zíper de leucina 1136	mRNA maternos 1161
hélice-alça-hélice básico 1136	genes de segmentação 1161
controle combinatório 1137	genes gap 1161
proteína receptora de cAMP (CRP) 1138	genes <i>pair-rule</i> 1161
regulon 1139	genes da polaridade do segmento 1161
atenuação de transcrição 1140	genes homeóticos 1162
repressor de tradução 1143	genes <i>Hox</i> 1164
resposta estrigente 1143	totipotentes 1165
ribocomutador 1145	pluripotentes 1166
variação de fase 1146	unipotentes 1166
remodelação da cromatina 1148	células-tronco embrionárias 1166
SWI/SNF 1148	
ISWI 1148	
CHD 1148	

Teste seu conhecimento

1. Efeito do mRNA e da estabilidade proteica sobre a regulação Triptofano é subitamente adicionado a células de *E. coli* que estão crescendo em um meio com glicose como única fonte de carbono. As células continuam a crescer e se dividem a cada 30 minutos. Descreva (qualitativamente) como a intensidade de atividade da triptofano-sintase nas células varia com o tempo sob seguintes condições:

- O mRNA *trp* é estável (degradado lentamente ao longo de várias horas).
- O mRNA *trp* é degradado rapidamente, mas a triptofano-sintase é estável.

(c) O mRNA *trp* e a triptofano-sintase são ambos degradados rapidamente.

2. O óperon da lactose Um pesquisador constrói um óperon *lac* em um plasmídeo, mas inativa todas as partes do operador *lac* (*lacO*) e o promotor *lac*, substituindo-os pelo sítio de ligação para o repressor LexA (que atua na resposta SOS) e um promotor regulado por LexA. O plasmídeo é introduzido nas células de *E. coli* que têm um óperon *lac* com um gene *lacZ* inativo. Em qual dessas condições as células transformadas produzirão β -galactosidase?

3. Regulação negativa Descreva os efeitos prováveis na expressão gênica no óperon *lac* de uma mutação no (a) operador *lac* que exclui a maioria dos O_1 , no (b) gene *lacI* que inativa o repressor e no (c) promotor que altera a região em torno da posição -10 .

4. Ligação específica do DNA por proteínas regulatórias Uma típica proteína repressora bacteriana é capaz de diferenciar entre o seu sítio de ligação específico (operador) e o DNA inespecífico por um fator de 10^4 a 10^6 . Cerca de 10 moléculas de repressor por célula são suficientes para garantir um alto nível de repressão. Suponha que um repressor muito semelhante existisse em uma célula humana, com especificidade por seu sítio de ligação. Quantas cópias do repressor seriam necessárias para provocar um nível de repressão semelhante àquele na célula bacteriana? (Dica: o genoma de *E. coli* contém cerca de 4,6 milhões de pb e o genoma haploide humano tem cerca de 3,2 bilhões de pb.)

5. Concentração de repressor em *E. coli* A constante de dissociação de um determinado complexo repressor-operador é muito baixa, cerca de 10^{-13} M. Cada célula de *E. coli* (volume de 2×10^{-12} mL) contém 10 cópias do repressor. Calcule a concentração celular da proteína repressora. Como esse valor se compara à constante de dissociação do complexo repressor-operador? Qual o significado dessa resposta?

6. Repressão por catabólitos Células de *E. coli* estão crescendo em um meio contendo lactose, mas não glicose. Indique se cada uma das seguintes alterações ou condições aumentaria, diminuiria ou não alteraria a expressão do óperon *lac*. Pode ser útil desenhar um modelo representando o que está acontecendo em cada situação.

- Adição de alta concentração de glicose.
- Mutação que impede a dissociação do repressor Lac do operador.
- Mutação que inativa completamente a β -galactosidase.
- Mutação que inativa completamente a galactosídeo-permease.
- Mutação que impede a ligação do CRP ao seu sítio de ligação perto do promotor *lac*.

7. Atenuação da transcrição Como a transcrição do óperon *trp* de *E. coli* pode ser afetada pelas seguintes manipulações da região-líder do mRNA *trp*?

- Aumentando a distância (número de bases) entre o gene do peptídeo-líder e a sequência 2.
- Aumentando a distância entre as sequências 2 e 3.
- Removendo a sequência 4.
- Alterando os dois códons Trp no gene do peptídeo para códons His.
- Eliminando o sítio de ligação do ribossomo para o gene que codifica o peptídeo-líder.

- (f) Alterando vários nucleotídeos na sequência 3, de modo que ela possa se parear com a sequência 4, mas não com a sequência 2.

8. Repressores e repressão Como a resposta SOS em *E. coli* seria afetada por uma mutação no gene *lexA* que impedisse a clivagem autocatalítica da proteína LexA?

9. Regulação por recombinação No sistema de variação de fase da *Salmonella*, o que aconteceria à célula se a recombinase Hin se tornasse mais ativa e promovesse a recombinação (inversão de DNA) várias vezes em cada geração celular?

10. Iniciação da transcrição em eucariotos Uma nova atividade da RNA-polimerase é descoberta em extratos brutos de células derivadas de um fungo exótico. A RNA-polimerase inicia a transcrição apenas a partir de um único promotor, altamente especializado. À medida que a polimerase é purificada, sua atividade diminui, e a enzima purificada é completamente inativa, a menos que extrato bruto seja adicionado à mistura de reação. Proponha uma explicação para essas observações.

11. Domínios funcionais em proteínas regulatórias Um bioquímico substitui o domínio de ligação de DNA da proteína Gal4 de levedura pelo domínio de ligação de DNA do repressor Lac e descobre que a proteína fabricada não regula mais a transcrição dos genes *GAL* em leveduras. Desenhe um diagrama dos diferentes domínios funcionais que se esperaria encontrar na proteína Gal4 e na proteína fabricada. Por que a proteína fabricada não regula mais a transcrição dos genes *GAL*? O que poderia ser feito ao sítio de ligação do DNA reconhecido por essa proteína quimérica para torná-la funcional na ativação da transcrição dos genes *GAL*?

12. Modificação do nucleossomo durante a ativação da transcrição A fim de preparar regiões do genoma para a transcrição, certas histonas nos nucleossomos residentes são acetiladas e metiladas em locais específicos. Uma vez que a transcrição não seja mais necessária, essas modificações precisam ser revertidas. Em mamíferos, a metilação dos resíduos Arg em histonas é revertida pelas peptidilarginina-deiminases (PADI). A reação catalisada por essas enzimas não produz uma arginina não metilada. Em vez disso, ela produz resíduos de citrulina na histona. Qual é o outro produto da reação? Sugira um mecanismo para essa reação.

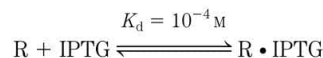
13. Repressão gênica em eucariotos Explique por que a repressão de um gene de organismo eucariótico por RNA pode ser muito mais eficiente do que por um repressor proteico.

14. Mecanismos de herança no desenvolvimento Um ovo de *Drosophila* que seja *bcd⁻bcd⁻* pode se desenvolver normalmente, mas a mosca-da-fruta adulta é incapaz de produzir uma prole viável. Como isso pode ser explicado?

Problema de análise de dados

15. Fabricando um interruptor genético alternado em *Escherichia coli* A regulação gênica é geralmente descrita como um fenômeno “ligado ou desligado”: um gene ou está totalmente expresso ou não é absolutamente expresso. Na verdade, a repressão e a ativação de um gene envolvem reações de ligação de ligantes, de modo que os genes podem apresentar níveis intermediários de expressão quando níveis

intermediários de moléculas regulatórias estão presentes. Por exemplo, para o óperon *lac* de *E. coli*, considere o equilíbrio de ligação do repressor Lac, do operador de DNA e do indutor (ver Figura 28-8). Embora esse seja um processo complexo e cooperativo, ele pode ser aproximadamente modelado pela reação a seguir (R é o repressor; IPTG é o indutor isopropil- β -D-tiogalactosídeo):



O repressor livre, R, liga-se ao operador e impede a transcrição do óperon *lac*; o complexo R IPTG não se liga ao operador e, portanto, a transcrição do óperon *lac* pode prosseguir.

- (a) Usando a Equação 5-8, pode-se calcular o nível de expressão relativa de proteínas do óperon *lac* como uma função de [IPTG]. Use esse cálculo para determinar em que faixa de [IPTG] o nível de expressão variaria de 10 a 90%.
- (b) Descreva qualitativamente o nível de proteínas do óperon *lac* presente em uma célula de *E. coli* antes, durante e depois de indução por IPTG. Não é necessário fornecer as quantidades nos tempos exatos – apenas indicar as tendências gerais.

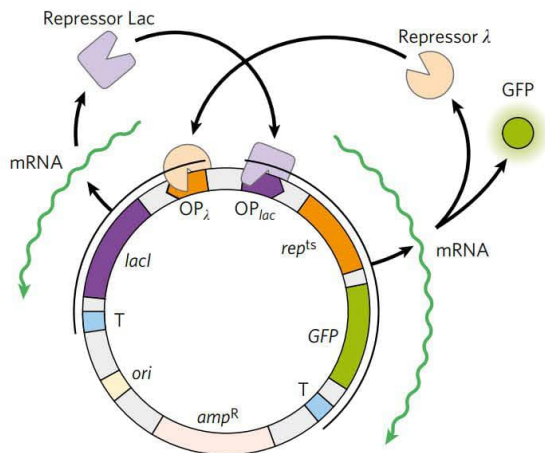
Gardner, Cantor e Collins (2000) se propuseram a construir um “interruptor genético alternado” (*genetic toggle switch*), ou seja, um sistema regulatório de genes com as duas características essenciais de um interruptor de luz. (A) *Ele tem apenas dois estados*: ou está totalmente ligado ou totalmente desligado, não é um interruptor que permite graduação. Em termos bioquímicos, o gene-alvo ou o sistema de genes (óperon) é expresso totalmente ou não expresso de maneira alguma; não se expressa em nível intermediário. (B) *Os dois estados são estáveis*: embora se deva usar um dedo para mudar o interruptor de luz de um estado para outro, uma vez que o dedo é retirado ele permanece naquele estado. Isso seria, em termos bioquímicos, a exposição a um indutor ou a algum outro sinal altera o estado de expressão do gene ou óperon, e ele permanece naquele estado depois que o sinal for removido.

- (c) Explique como o óperon *lac* não apresenta nenhuma das características A e B.

Para construir seu “interruptor alternado”, Gardner e colaboradores construíram um plasmídeo a partir dos seguintes componentes:

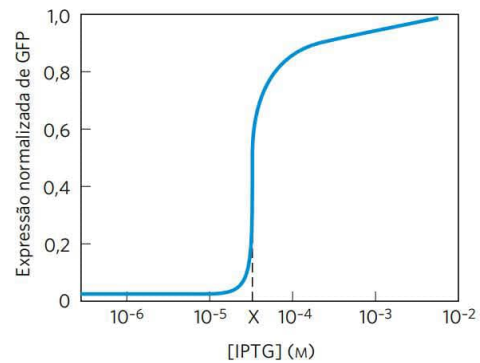
<i>ori</i>	Uma origem de replicação
<i>amp^R</i>	Um gene que confere resistência ao antibiótico ampicilina
<i>OP_{lac}</i>	A região operador-promotor do óperon <i>lac</i> de <i>E. coli</i>
<i>OP_λ</i>	A região operador-promotor do fago λ
<i>lacI</i>	O gene que codifica a proteína repressora do <i>lac</i> , LacI. Na ausência de IPTG, essa proteína reprime fortemente o <i>OP_{lac}</i> ; na presença de IPTG, ela permite a expressão total de <i>OP_{lac}</i> .
<i>rep^{ts}</i>	O gene codifica para uma proteína repressora λ mutante que é sensível à temperatura, <i>rep^{ts}</i> . A 37°C, essa proteína reprime fortemente <i>OP_λ</i> ; a 42°C, ela permite a expressão total a partir do <i>OP_λ</i> .
<i>GFP</i>	O gene para a proteína fluorescente verde (GFP), uma proteína indicadora altamente fluorescente (ver Figura 9-16).
T	Terminador de transcrição

Os pesquisadores organizaram todos esses componentes de acordo com o que está mostrado na figura a seguir, de modo que os dois promotores se reprimem reciprocamente: OP_{lac} controlava a expressão de rep^{ts} e OP_{λ} controlava a expressão de $lacI$. O estado desse sistema era registrado pelo nível de expressão de GFP , que também estava sob controle de OP_{lac} .



- O sistema construído tem dois estados: GFP-ligado (alto nível de expressão) e GFP-desligado (baixo nível de expressão). Para cada estado, descreva quais proteínas estão presentes e quais promotores estão sendo expressos.
- Espera-se que o tratamento com IPTG alterne o sistema de um estado a outro. De qual estado para qual estado? Explique o raciocínio utilizado.
- Seria de esperar que o tratamento com calor (42°C) mudaria o sistema de um estado para outro. De qual estado para qual estado? Explique o seu raciocínio.
- Por que se espera que esse plasmídeo tenha as características A e B descritas anteriormente?

Para confirmar que a essa construção exibe, de fato, essas características, Gardner e colaboradores demonstraram pela primeira vez que, uma vez ligado, o nível de expressão do GFP (alto ou baixo) era estável por longos períodos de tempo (característica B). Em seguida, eles mediram o nível de GFP em diferentes concentrações do indutor IPTG, com os seguintes resultados.



Eles notaram que o nível médio de expressão do GFP foi intermediário na concentração X de IPTG. Contudo, ao medirem o nível de expressão de GFP em células individuais com [IPTG] = X, eles descobriram um alto ou baixo nível de GFP e nenhuma célula apresentou níveis intermediários.

- Explique como essa descoberta demonstra que o sistema tem um A característico. O que está acontecendo para provocar uma distribuição bimodal dos níveis de expressão na [IPTG] = X?

Referência

Gardner, T.S., C.R. Cantor e J.J. Collins. 2000. Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. *Nature* 403:339–342.

Teste seu conhecimento: solução dos problemas

As respostas de todos os problemas no final de cada capítulo estão relacionadas a seguir

Capítulo 1

1. (a) Diâmetro da célula ampliada = 500 mm. (b) $2,7 \times 10^{12}$ moléculas de actina. (c) 36.000 mitocôndrias. (d) $3,9 \times 10^{10}$ moléculas de glicose. (e) 50 moléculas de glicose por molécula de hexocinase.

2. (a) 1×10^{-12} g = 1 pg. (b) 10%. (c) 5%.

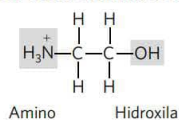
3. (a) 1,6 mm; comprimento 800 vezes mais longo do que a célula; o DNA deve estar fortemente enrolado. (b) 4.000 proteínas.

4. (a) A velocidade do metabolismo é limitada pela difusão, que, por sua vez, é limitada pela área da superfície. (b) $12 \mu\text{m}^{-1}$ para a bactéria; $0,04 \mu\text{m}^{-1}$ para a ameba; a relação superfície-volume é 300 vezes superior na bactéria.

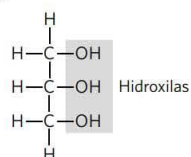
5. 2×10^6 s (cerca de 23 dias).

6. As moléculas de vitamina das duas fontes são idênticas; o organismo não é capaz de distinguir qual a fonte; apenas as impurezas contaminantes podem variar em decorrência da fonte.

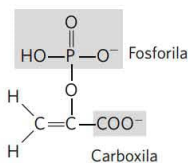
7. (a)



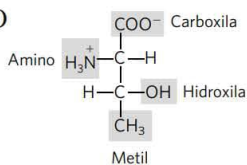
(b)



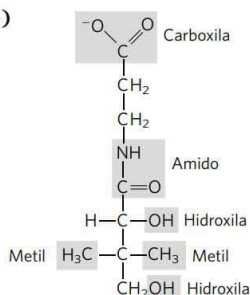
(c)



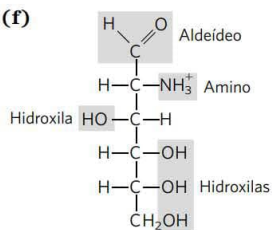
(d)



(e)

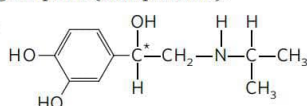


(f)



Os dois enantiômeros fazem interações diferentes com o "receptor" biológico quiral (uma proteína).

8.



Os dois enantiômeros fazem interações diferentes com o "receptor" biológico quiral (uma proteína).

9. (a) Apenas aminoácidos possuem grupos amina; a separação pode ter como base a carga ou a afinidade de ligação desses grupos. Os ácidos graxos são menos solúveis em água do que os aminoácidos, e os

dois tipos de moléculas também são diferentes em tamanho e forma; qualquer uma dessas propriedades pode ser a base para a separação.

(b) A glicose é uma molécula menor do que um nucleotídeo; a separação pode se basear no tamanho. A base nitrogenada e/ou o grupo fosfato dão características (solubilidade, carga) que podem ser usadas para separá-los da glicose.

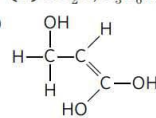
10. É improvável que o silício pudesse servir como o elemento central de organização da vida, principalmente em uma atmosfera contendo O_2 , como é a atmosfera da Terra. Cadeias longas de silício não podem ser sintetizadas com facilidade; as macromoléculas necessárias para funções mais complexas não poderiam se formar facilmente. O oxigênio perturba as ligações entre átomos de silício, e as ligações silício-oxigênio são extremamente estáveis e muito difíceis de serem rompidas, evitando romper e fazer ligações, o que é essencial para os processos da vida.

11. Apenas um dos enantiômeros da droga tem atividade fisiológica. A Dexedrina consiste em um único enantiômero e a Benzedrina é uma mistura racêmica.

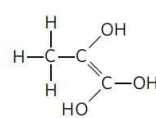
12. (a) Três grupos ácido fosfórico; α -D-ribose; guanina. (b) Colina; ácido fosfórico; glicerol; ácido oleico; ácido palmítico. (c) Tirosina; 2 glicinas; fenilalanina; metionina.

13. (a) CH_2O ; $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$

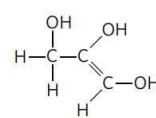
(b)



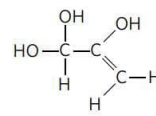
1



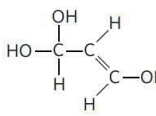
2



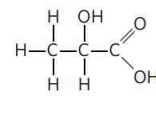
3



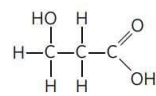
4



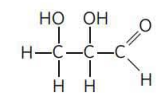
5



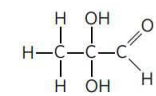
6



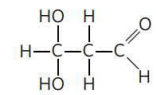
7



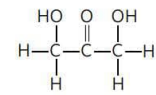
8



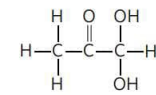
9



10



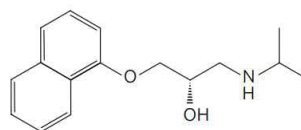
11



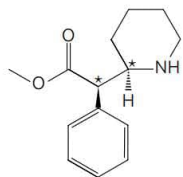
12

(c) X contém um centro quiral; eliminar todas menos 6 e 8. (d) X contém um grupo funcional ácido; elimina 8; a estrutura 6 é compatível com todos os dados. (e) A estrutura 6; não se pode fazer distinção entre os dois possíveis enantiômeros.

14. O composto mostrado é o (R)-propranolol; o carbono ligando o grupo hidroxila é o carbono quiral. O (S)-Propranolol tem a estrutura:



15. O composto mostrado é a (*S,S*)-metilfenidato. (*R,R*)-metilfenidato tem a estrutura:

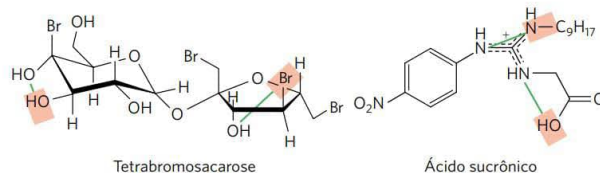
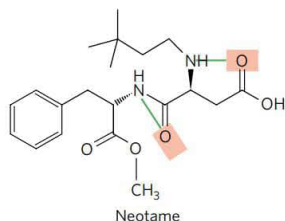
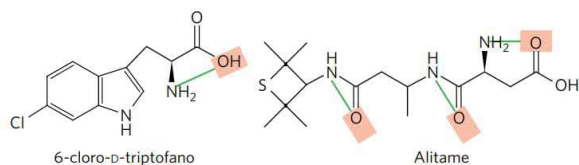
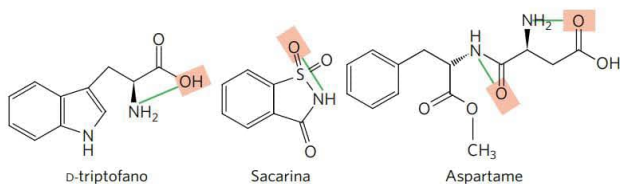
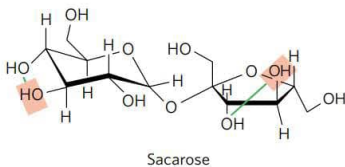
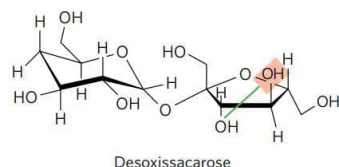


Os carbonos quirais estão indicados por asteriscos.

16. (a) Um ΔG° mais negativo corresponde a uma K_{eq} maior para a reação de associação, assim, o equilíbrio é desviado mais na direção da formação de produtos e liga fortemente, de modo que é mais doce e tem DMR maior. (b) Testes de doçura baseados em animais são demorados. Um programa de computador para prever doçura, mesmo se não for muito acurado, ajuda os químicos a planejarem adoçantes com mais rapidez. As moléculas candidatas podem, então, ser testadas em ensaios convencionais. (c) A faixa de 0,25 a 0,4 nm corresponde a comprimentos de 1,5 a 2,5 ligações simples. A figura abaixo pode ser usada para construir uma régua aproximada; cada um dos átomos no retângulo vermelho está entre 0,25 a 0,4 nm da origem da régua.



Existem muitos grupos AH-B possíveis nas moléculas; alguns deles estão mostrados aqui.



(d) Primeiro, cada molécula tem vários grupos AH-B, de modo que é difícil saber qual deles é o importante. Segundo, como o motivo AH-B é muito simples, muitas moléculas que não são doces têm esse grupo. (e) Sacarose e desoxissacarose. A desoxissacarose não tem um dos grupos AH-B presentes na sacarose e tem um DMR levemente menor do que o DMR da sacarose, como é esperado caso os grupos AH-B sejam importantes para a doçura. (f) Existem muitos exemplos disso, aqui são apresentados alguns deles: (1) D-triptofano e 6-cloro-D-triptofano têm o mesmo grupo AH-B, mas valores de DMR muito diferentes. (2) Aspartame e neotame têm os mesmos grupos AH-B, mas valores de DMR muito diferentes. (3) Neotame tem dois grupos AH-B e alitame tem três, mesmo assim neotame é mais de cinco vezes mais doce do que alitame. (4) Bromo é menos eletronegativo do que o oxigênio e se espera que tenha um grupo AH-B mais fraco, ainda assim tetrabromosacarose é muito mais doce do que sacarose. (g) "Ajustando" suficientemente os parâmetros, qualquer modelo pode se ajustar a um conjunto definido de dados. Uma vez que o objetivo é criar um modelo para prever ΔG° de moléculas não testadas *in vivo*, os pesquisadores precisam mostrar que o modelo funciona bem para moléculas não usadas nos testes. O grau de acurácia do teste pode dar aos pesquisadores uma ideia de como o modelo se comportará para moléculas novas. (h) DMR está relacionada com a K_{eq} , que se relaciona exponencialmente com ΔG° , assim, a adição de um valor constante a ΔG° multiplica o DMR por esse valor constante. Com base nos valores dados com as estruturas, uma mudança de 1,3 kcal/mol no ΔG° corresponde a uma mudança de 10 vezes no DMR.

Capítulo 2

1. A intensidade da força de atração iônica é proporcional ao *inverso* da constante dielétrica. Um "solvente" hidrofóbico, como o ambiente no interior das proteínas, tem uma constante dielétrica menor do que um solvente polar em água.

2. As interações entre duas moléculas geralmente necessitam ser reversíveis; interações fracas possibilitam reversibilidade.

3. O etanol é polar, o etano, não. O grupo —OH do etanol pode formar uma ligação de hidrogênio com água.

4. (a) 4,76. (b) 9,19. (c) 4,0. (d) 4,82.

5. (a) $1,51 \times 10^{-4}$ M. (b) $3,02 \times 10^{-7}$ M. (c) $7,76 \times 10^{-12}$ M.

6. 1,1

7. (a) $\text{HCl} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{Cl}^-$. (b) 3,3. (c) $\text{NaOH} \rightleftharpoons \text{Na}^+ + \text{OH}^-$. (d) 9,8.

8. 1,1

9. $1,7 \times 10^{-9}$ mol de acetilcolina.

10. 0,1 M HCl.

11. (a) Muito maior. (b) Maior. (c) Menor.

12. 3,3 mL.

13. (a) RCOO^- . (b) RNH_2 . (c) H_2PO_4^- . (d) HCO_3^- .

14. (a) 5,06. (b) 4,28. (c) 5,46. (d) 4,76. (e) 3,76.

15. (a) 0,1 M HCl. (b) 0,1 M NaOH. (c) 0,1 M NaOH.

16. (d) O bicarbonato, uma base fraca, titula —OH em O^- , tornando o composto mais polar e mais solúvel em água.

17. Estômago, a forma neutra do ácido acetilsalicílico presente em pH baixo é menos polar e passa através da membrana com mais facilidade.

18. 9

19. 7,4

20. (a) pH 8,6 a 10,6. (b) 4/5. (c) 10 mL. (d) $\text{pH} = \text{p}K_a - 2$.

21. 8,9

22. 2,4
 23. 6,9
 24. 1,4
 25. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 5,8 g/L; Na_2HPO_4 , 8,2 g/L
 26. $[\text{A}^-]/[\text{HA}] = 0,10$
 27. Misturando 150 mL de acetato de sódio 0,10 M com 850 mL de ácido acético 0,10 M.
 28. Ácido acético; o seu pK_a está próximo do pH desejado.
 29. (a) 4,6. (b) 0,1 unidades de pH. (c) 4 unidades de pH.
 30. 4,3
 31. Acetato 0,13 M e ácido acético 0,07 M.
 32. 1,7
 33. 7
 34. (a)
- $\begin{array}{c} \text{COOH} \\ | \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{H} \\ | \\ \text{CH}_3 \end{array}$

Totalmente protonado

$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ | \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{H} \\ | \\ \text{CH}_3 \end{array}$

Totalmente desprotonado

(b) Totalmente protonado. (c) Zwitterion. (d) Zwitterion. (e) Totalmente desprotonado.

35. (a) O pH do sangue é controlado pelo sistema tampão carbonato-dióxido de carbono, $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$. Durante a *hipoventilação*, a $[\text{CO}_2]$ aumenta nos pulmões e no sangue arterial, levando o equilíbrio ao máximo, aumentando $[\text{H}^+]$ e diminuindo o pH. (b) Durante a *hiperventilação*, $[\text{CO}_2]$ diminui nos pulmões e no sangue arterial, diminuindo $[\text{H}^+]$ e aumentando o pH para acima do valor normal de 7,4. (c) Lactato é um ácido moderadamente forte, ele se dissocia completamente em condições fisiológicas, baixando o pH do sangue e do tecido muscular. A hiperventilação remove H^+ , aumentando o pH do sangue e dos tecidos em antecipação à produção de ácidos.

36. 7,4

37. Dissolver mais CO_2 no sangue aumenta a $[\text{H}^+]$ no sangue e nos líquidos extracelulares, diminuindo o pH. $\text{CO}_2(\text{d}) + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$

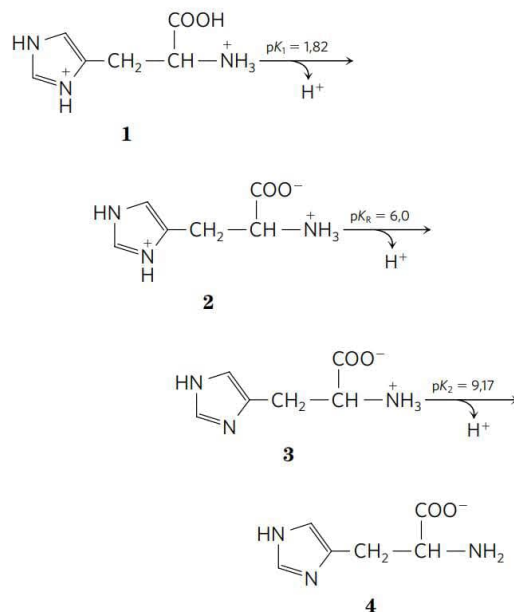
38. (a) Usar a substância na forma surfactante para emulsificar o óleo derramado, coletar o óleo emulsificado e, então, mudar para a forma não surfactante. O óleo separa-se da água e pode ser coletado para uso posterior. (b) O equilíbrio desloca-se fortemente para a direita. O ácido mais forte (pK_a baixo), o H_2CO_3 , doa um próton para a base conjugada (amidina) do ácido mais fraco (pK_a alto). (c) O poder de um surfactante depende da hidrofilicidade dos grupos da cabeça: quanto mais hidrofílicos, mais poderoso é o surfactante. A forma amidino do s-surf é muito mais hidrofílica do que a forma amidina, então ela é um surfactante mais poderoso. (d) Ponto A: amidino; o CO_2 tem tempo suficiente para reagir com a amidina para produzir a forma amidino. Ponto B: amidina; o ar removeu CO_2 da solução, liberando a forma amidina. (e) A condutividade aumenta à medida que a amidina não carregada reage com CO_2 , produzindo a forma amidino não carregada. (f) A condutividade diminui à medida que o ar remove CO_2 , deslocando o equilíbrio para a forma amidina (não carregada). (g) Tratar s-surf com CO_2 para produzir a forma amidino do surfactante e usar para emulsificar o derramamento. Borbulhar ar na emulsão para remover CO_2 e produzir a forma não surfactante (amidina). O óleo separa-se da água e pode ser recuperado.

Capítulo 3

1. I; determine a configuração absoluta do carbono α e compare com D e L-gliceraldeído.
 2. (a) I (b) II (c) IV (d) II (e) IV (f) II e IV (g) III (h) III (i) V (j) III (k) V (l) II (m) III (n) V (o) I, III e V
 3. (a) $\text{pI} > \text{pK}_a$ para o grupo α -carboxila e $\text{pI} < \text{pK}_a$ para o grupo α -aminoácido, então, ambos os grupos estão carregados (ionizados). (b) I em $2,19 \times 10^7$. O pI da alanina é 6,01. Tomando da Tabela 3-1 e da

equação de Henderson-Hasselbalch, 1/4.680 carboxilas e 1/4.680 grupos amina não estão carregados. A fração de moléculas de alanina com ambos os grupos não carregados é o produto dessas frações.

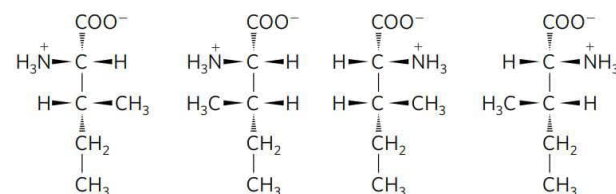
4. (a), (b), (c)



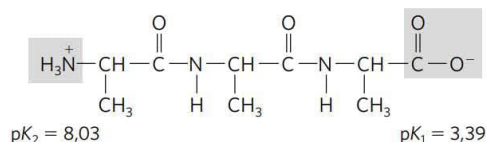
pH	Estrutura	Carga líquida	Migra para
1	1	+2	Cátodo
4	2	+1	Cátodo
8	3	0	Não migra
12	4	-1	Ânodo

5. (a) Asp (b) Met (c) Glu (d) Gly (e) Ser

6. (a) 2 (b) 4 (c)



7. (a) Estrutura em pH 7:



(b) A interação eletrostática entre o ânion carboxilato e o grupo amina protonado da alanina na forma de zwitterion afeta favoravelmente a ionização do grupo carboxila. Essa interação eletrostática favorável diminui à medida que o comprimento da cadeia poli(Ala) aumenta, resultando em aumento no pK_1 . (c) A ionização do grupo amina protonado destrói a interação eletrostática favorável mencionada em (b). O aumento da distância entre os grupos carregados faz a remoção do próton do grupo amina na poli(Ala) tornar-se mais fácil, e o pK_2 fica menor. Os efeitos intramoleculares da ligação amida (ligação peptídica) mantêm os valores de pK_a menores que os de uma amina substituída com uma alquila.

8. 75.000

9. (a) 32.000. Há perda dos elementos da água quando a ligação peptídica se forma, de modo que o peso molecular do resíduo de Trp não é o peso molecular do triptofano livre. **(b)** 2.

10. A proteína tem quatro subunidades, com massas moleculares de 160, 90, 90 e 60 kDa. As duas subunidades de 90 kDa (possivelmente idênticas) estão ligadas por uma ou mais ligações dissulfeto.

11. (a) em pH 3, +2; em pH 8, 0; em pH 11, -1. **(b)** pI = 7,8.

12. pI ≈ 1; grupos carboxilato; Asp e Glu.

13. Lys, His, Arg; os grupos negativamente carregados do DNA interagem com os grupos positivamente carregados das cadeias laterais das histonas.

14. (a) (Glu)₂₀. **(b)** (Lys-Ala)₃. **(c)** (Asn-Ser-His)₅. **(d)** (Asn-Ser-His)₅.

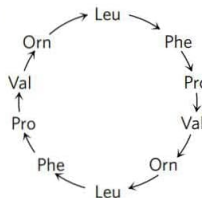
15. (a) Após a etapa 1, a especificidade é 200 unidades/mg; após a etapa 2 é 600 unidades/mg; após a etapa 3, 3.250 unidades/mg; após a etapa 4, 4.000 unidades/mg; após a etapa 5, 15.000 unidades/mg; após a etapa 6, 15.000 unidades/mg. **(b)** Etapa 4. **(c)** Etapa 3. **(d)** Sim. A atividade específica não aumentou na etapa 6; eletroforese em gel de SDS poliacrilamida.

16. (a) [NaCl] = 0,5 mM. **(b)** [NaCl] = 0,05 mM.

17. Primeiro elui C, depois B, e A por último.

18. Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu

19.



As flechas correspondem à orientação das ligações peptídicas, —CO → NH—.

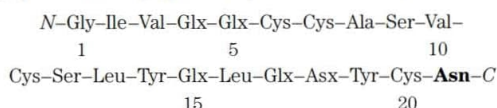
20. 88%, 97%. A porcentagem (x) do aminoácido correto liberado em cada ciclo n é x_n/x . Todos os resíduos liberados no primeiro ciclo estão corretos, mesmo que a eficiência da clivagem não ter sido perfeita.

21. (a) Y (1), F (7) e R (9). **(b)** Posições 4 e 9; K (Lys) é mais comum na posição 4, R (Arg) não varia na posição 9. **(c)** Posições 5 e 10; E (Glu) é mais comum nas duas posições. **(d)** Posição 2; S (Ser).

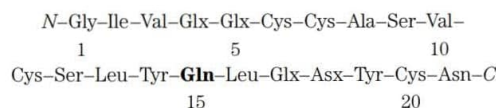
22. (a) Peptídeo 2. **(b)** Peptídeo 1. **(c)** Peptídeo 2. **(d)** Peptídeo 3.

23. (a) Em toda a cadeia linear do polipeptídeo há apenas dois tipos de grupos amina livres: o grupo α -amina único da extremidade aminoterminal e um grupo ϵ -amino em cada um dos resíduos de Lys. Esses grupos amino reagem com FDNB, formando derivados de aminoácidos DNP. A insulina produz dois derivados DNP- α -amino-DNP e isso sugere que existem dois grupos aminoterminal e duas cadeias polipeptídicas — uma com Gly aminoterminal e outra com Phe aminoterminal. Uma vez que o produto DNP-lisina é ϵ -DNP-lisina, Lys não está na posição aminoterminal. **(b)** Sim. A cadeia A tem Gly como aminoterminal, a cadeia B tem Phe como aminoterminal e o resíduo (não aminoterminal) 29 na cadeia B é Lys. **(c)** Phe-Val-Asp-Glu-. O peptídeo B1 indica que o resíduo aminoterminal é Phe. O peptídeo B2 também tem Val, mas como não há formação de DNP-Val, Val não está na posição aminoterminal; deve estar no lado carboxila de Phe. Assim, a sequência de B2 é DNP-Phe-Val. De maneira semelhante, a sequência de B3 deve ser DNP-Phe-Val-Asp, e a sequência da cadeia A deve começar por Phe-Val-Asp-Glu-. **(d)** Não. A sequência conhecida para a extremidade aminoterminal da cadeia A é Phe-Val-Asn-Gln-. Asn e Gln aparecem na análise de Sanger como Asp e Glu porque a hidrólise vigorosa na etapa 7 hidrolisou as ligações amida de Asn e Gln (e também as ligações peptídicas), formando Asp e Glu. Sanger et al. não puderam discriminar Asp de Asn e Glu de Gln nesta etapa das análises. **(e)** A sequência corresponde exatamente à sequência da Figura 3-24. Cada peptídeo na tabela dá uma informação específica sobre quais dos resíduos Asx são Asn ou Asp e quais dos resíduos Glx são Glu ou Gln.

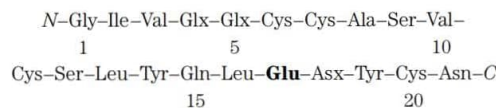
Ac1: resíduos 20-21. Há apenas uma sequência Cys-Asx na cadeia A. Neste peptídeo há ~1 grupo amido, então deve ser Cys-Asn:



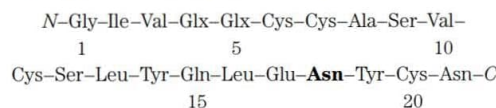
Ap15: resíduos 14-15-16. Há somente um Tyr-Glx-Leu na cadeia A e ~1 grupo amida, então o peptídeo deve ser Tyr-Gln-Leu:



Ap14: resíduos 14-15-16-17. Esse peptídeo tem ~1 grupo amida e já se sabe que o resíduo 15 é Gln, então o resíduo 17 deve ser Glu:

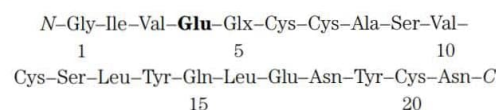


Ap3: resíduos 18-19-20-21. Há ~2 grupos amida e já se sabe que o resíduo 21 é Asn, então o resíduo 18 deve ser Asn:

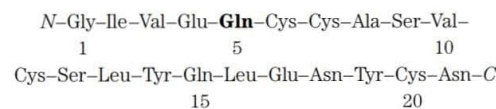


Ap1: resíduos 17-18-19-20-21, que são consistentes com o fato de os resíduos 18 e 21 serem Asn.

Ap5pa1: resíduos 1-2-3-4. Há ~0 grupos amida, então o resíduo 4 deve ser Glu:



Ap5: resíduos de 1 a 13. Há ~1 grupo amida e se sabe que o resíduo 4 é Glu, então o resíduo 5 deve ser Gln:



Capítulo 4

1. (a) As ligações mais curtas têm uma ordem maior de ligação (ligações múltiplas em vez de ligação simples). A ligação C—N peptídica é mais forte do que uma ligação simples e tem características que estão no meio do caminho entre uma ligação simples e uma ligação dupla. **(b)** É difícil haver rotação ao redor da ligação peptídica em temperaturas fisiológicas devido a esta propriedade de ligação dupla parcial.

2. (a) As principais unidades estruturais de uma fibra de lã (α -queratina) são voltas sucessivas de α -hélice, a intervalos de 5,4 Å; espirais de espirarias produzem o espaçamento de 5,2 Å. Ferver e esticar a fibra leva a uma cadeia polipeptídica estendida de conformação β com uma distância entre grupos R adjacentes de 7,0 Å. À medida que o polipeptídeo reassume a estrutura de α -hélice, a fibra fica mais curta. **(b)** A lã encolhe na presença de calor úmido à medida que as cadeias polipeptídicas são convertidas da conformação β para a conformação nativa de α -hélice. A estrutura da seda — folhas β com cadeias laterais de aminoácido pequenas e compactas — é mais estável do que a estrutura da lã.

3. Cerca de 42 ligações peptídicas por segundo.

4. Em pH > 6, os grupos carboxílicos do poli(Glu) estão desprotonados, e a repulsão entre os grupos carboxilato carregados negativamente leva ao desenovelamento. De maneira semelhante, em pH 7 os grupos amino da poli(Lys) estão protonados, e a repulsão entre esses grupos carregados positivamente leva ao desenovelamento.

5. (a) Ligações dissulfeto são ligações covalentes muito mais fortes do que as interações não covalentes que estabilizam a maioria das proteínas. Elas fazem ligações transversais entre cadeias proteicas, aumentando a rigidez, a resistência mecânica e a dureza. **(b)** Os resíduos de cistina (ligação dissulfeto) evitam o desenovelamento completo da proteína.

6. $\varphi = (\mathbf{f})$ e $\psi = (\mathbf{e})$

7. (a) Curvaturas são mais prováveis nos resíduos 7 e 19, pois os resíduos de Pro em configuração *cis* acomodam bem as curvas. (b) Os resíduos de Cys nas posições 13 e 14 podem formar ligações dissulfeto. (c) Superfície externa: polar e com resíduos com carga (Asp, Gln, Lys); interior: com resíduos alifáticos (Ala, Ile); Thr, embora polar possua um índice de hidropatia próximo a zero e possa ser encontrada tanto na superfície externa como no interior da proteína.

8. Trinta resíduos de aminoácidos; 0,87.

9. A mioglobina é as três coisas. A estrutura enovelada, "enovelamento da globina", é o motivo em todas as globinas. O polipeptídeo enovela-se em um domínio único que, para essa proteína, é toda a estrutura tridimensional.

10. Proteína (a), um barril β , está descrita no diagrama de Ramachandran (c), o qual mostra a maioria das conformações possíveis no quadrante superior esquerdo, onde estão concentrados os ângulos de ligação característicos de conformação β . Proteína (b), uma série de α -hélices, descrita pelo gráfico (d), onde a maioria das conformações possíveis estão no quadrante inferior esquerdo.

11. A enzima bacteriana é a collagenase. Ela destrói a barreira do tecido conectivo do hospedeiro, fazendo a bactéria invadir os tecidos. A bactéria não possui colágeno.

12. (a) O número de moles de DNP-valina formados por mol de proteína é igual ao número de aminoterminais e, portanto, esse é o número de cadeias polipeptídicas. (b) 4. (c) Cadeias diferentes, provavelmente, migram como bandas discretas em um gel de SDS-poliacrilamida.

13. Peptídeo (a); ele possui mais resíduos de aminoácidos que favorecem a estrutura em α -hélice (ver Tabela 4-1).

14. (a) Os resíduos aromáticos parecem desempenhar um papel importante na estabilização de fibrilas amiloides. Desse modo, moléculas com substituintes aromáticos podem inibir a formação de amiloide por interferirem no empilhamento ou na associação das cadeias laterais aromáticas. (b) A formação de amiloide no pâncreas está associada com diabetes tipo 2, e na doença de Alzheimer há formação de amiloide no cérebro. Embora as fibrilas amiloides nas duas doenças envolvam proteínas diferentes, nas duas doenças as estruturas fundamentais dos amiloides são semelhantes e estabilizadas de maneira similar, de modo que elas são alvos em potencial para planejar fármacos parecidos para desfazer o amiloide.

15. (a) Fator de transcrição NF κ B, também denominado fator de transformação RelA. (b) Não, seriam obtidos resultados semelhantes apenas se a lista tivesse um número maior de proteínas. (c) A proteína tem duas subunidades. Há muitas variantes das subunidades e as mais bem caracterizadas têm 50, 52 e 65 kDa. Elas pareiam uma com a outra, formando vários homodímeros e heterodímeros. As estruturas de várias variantes diferentes podem ser encontradas no PDB. (d) O fator de transcrição NF κ B é uma proteína dimerica que se liga a sequências específicas de DNA, aumentando a transcrição de genes próximos a essas sequências. Um desses genes é para a cadeia leve κ (kappa) das imunoglobulinas, de onde vem o nome do fator de transcrição.

16. (a) Aba é um substituto apropriado, visto que Aba e Cys têm cadeias laterais com praticamente o mesmo tamanho e hidrofobicidade semelhante. Entretanto, Aba não forma ligações dissulfeto e, assim, não pode ser um substituto apropriado caso seja necessário formar ligação dissulfeto. (b) Existem muitas diferenças importantes entre uma proteína sintética e a protease do HIV produzida em uma célula humana, e cada uma delas pode levar a uma enzima sintética inativa. (1) Embora Aba e Cys tenham tamanho e hidrofobicidade semelhantes, o Aba pode não ser suficientemente similar para que a proteína enovele adequadamente. (2) A protease do HIV necessita de ligações dissulfeto para funcionar adequadamente. (3) Muitas proteínas sintetizadas nos ribossomos se enovelam enquanto estão sendo produzidas. A proteína desse estudo se enovela apenas depois que a cadeia está completa. (4) As proteínas sintetizadas por ribossomos podem interagir com os ribossomos à medida que elas se enovelam, e, no caso desse estudo, isso não é possível. (5) O citosol é uma solução mais complexa do que o tampão usado no estudo; algumas proteínas podem precisar de proteínas específicas ainda desconhecidas para um enovelamento apropriado. (6) Para um enovelamento adequado, as proteínas

sintetizadas nas células geralmente precisam de chaperonas, que estão ausentes no tampão usado no estudo. (7) Nas células, a protease do HIV é sintetizada como parte de uma cadeia maior que, então, é processada por proteólise, e a proteína do estudo foi sintetizada como uma molécula única. (c) Uma vez que a enzima *funciona* quando Aba substitui Cys, conclui-se que ligações dissulfeto não têm um papel importante para a estrutura da protease do HIV. (d) *Modelo 1*: enovela-se como a L-protease. *Argumento a favor*: a estrutura covalente é a mesma (exceto pela quiralidade) e, assim, ela enovela-se como a L-protease. *Argumento contra*: a quiralidade não é um detalhe trivial; a forma tridimensional é uma característica fundamental das moléculas biológicas. A enzima sintética não se enovela como a L-protease. *Modelo 2*: ela enovela-se-á como imagem especular da L-protease. *A favor*: uma vez que os componentes individuais são imagens especulares daqueles presentes na proteína biológica, a proteína enovela-se-á como uma imagem especular. *Contra*: as interações envolvidas no enovelamento de uma proteína são muito complexas, de maneira que a proteína sintética provavelmente se enovela de outra maneira. *Modelo 3*: enovela-se-á de modo diferente. *A favor*: as interações envolvidas no enovelamento de uma proteína são muito complexas, de maneira que a proteína sintética provavelmente se enovela de outra maneira. *Contra*: uma vez que os componentes individuais são imagens especulares daqueles presentes na proteína biológica, a proteína enovela-se-á como uma imagem especular. (e) *Modelo 1*. A enzima é ativa, mas para uma forma enantiomérica do substrato biológico ela é inibida pela forma enantiomérica do inibidor biológico. Isso é compatível com uma D-protease que seja a imagem especular de uma L-protease. (f) O azul de Evans é aquiral; ele se liga com as duas formas da enzima. (g) Não. Como a protease contém apenas aminoácidos L e reconhece apenas peptídeos L, a quimotripsina não digere a D-protease. (h) Não necessariamente. Dependendo da enzima em questão, qualquer dos problemas listados em (b) podem determinar que a enzima seja inativa.

Capítulo 5

1. A proteína B tem maior afinidade pelo ligante X; ela estará com metade da saturação em uma concentração de X muito menor do que a proteína A estaria. A proteína A tem $K_a = 10^6 \text{ M}^{-1}$; a proteína B tem $K_a = 10^9 \text{ M}^{-1}$.

2. (a), (b), (c) $n_H < 1,0$. A aparente cooperatividade negativa em uma ligação com um ligante pode decorrer da presença de dois sítios de ligação com afinidades diferentes para o ligante ou em proteínas diferentes presentes na mesma solução. A aparente cooperatividade negativa também é, geralmente, encontrada em preparações heterogêneas de proteínas. Há poucos casos bem documentados de cooperatividade negativa verdadeira.

3. (a) Diminui. (b) Aumenta. (c) Diminui. (d) Aumenta.

4. $k_d = 8,9 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$.

5. (a) 0,13 pM. (b) 0,6 pM. (c) 7,6 μM .

6. (a) 0,5 nM (dica: K_d equivale à concentração do ligante quando $Y = 0,5$). (b) A proteína 2 tem a maior afinidade e a menor K_d .

7. O comportamento de cooperatividade apresentado pela hemoglobina deve-se a interações entre subunidades.

8. (a) O fato de que a HbA (materna) está 60% saturada quando a pO_2 é 4 kPa enquanto a (fetal) está mais de 90% saturada quando ambas estão nas mesmas condições fisiológicas indica que a HbF tem maior afinidade pelo O_2 que a HbA. (b) A maior afinidade do O_2 pela HbF garante que, na placenta, o oxigênio passe do sangue materno para o sangue fetal. O sangue fetal aproxima-se da saturação completa quando a finidade do O_2 pela HbA for menor. (c) A observação de que a curva de saturação da HbA por O_2 sofre uma mudança maior do que a curva da HbF quando BPG está ligado indica que a HbA BPG se liga mais firmemente do que a HbF. A diferença entre as duas hemoglobinas quanto à ligação com BPG pode ser a responsável pela diferença nas suas afinidades por O_2 .

9. (a) Hb Memphis. (b) HbS, Hb Milwaukee, Hb Providence, possivelmente Hb Cowtown. (c) Hb Providence.

10. Mais firmemente. A incapacidade de formar tetrâmeros pode limitar a cooperatividade dessas Hb variantes, e as curvas de ligação tornam-se mais hiperbólicas. Também, o sítio de ligação à BPG pode estar desfeito. Provavelmente, a ligação com oxigênio pode ser mais intensa porque o estado normal na ausência de BPG ligada é o estado de R, de ligação intensa.

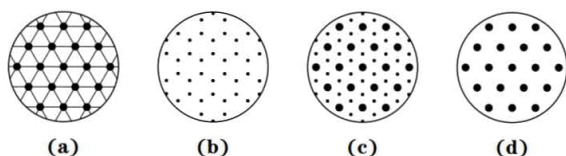
11. (a) 1×10^{-8} M. (b) 5×10^{-8} M. (c) 8×10^{-8} M. (d) 2×10^{-7} M. Observe que o rearranjo da Equação 5-8 dá $[L] = YK_d/(1 - Y)$.

12. É mais provável que o epítipo seja a estrutura que é escondida quando a actina G polimeriza, formando actina F.

13. Muitos patógenos, inclusive o HIV, possuem mecanismos para alterar sucessivamente as estruturas das suas superfícies às quais os componentes do sistema imune se ligam inicialmente. Assim, o organismo hospedeiro sempre encontra novos antígenos e necessita de tempo para montar uma resposta imune para cada um deles. Assim que o sistema imune responde para uma variante, uma nova variante é criada.

14. A ligação do ATP à miosina a faz se dissociar do filamento fino de actina. Na ausência de ATP, a actina.

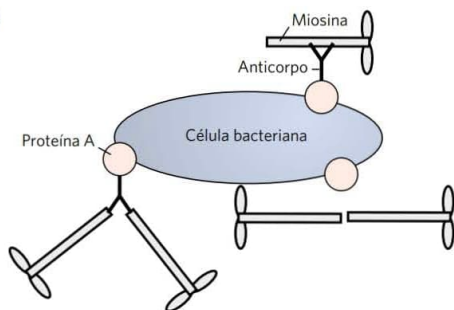
15.



16. (a) No fragmento Fab, a cadeia L é a cadeia leve, e a cadeia H é a cadeia pesada. A cadeia Y é a lisozima. (b) Nas regiões variável e constante do fragmento predominam estruturas β . (c) Fragmento da cadeia pesada do FAB: 218 resíduos de aminoácidos; fragmento de cadeia leve: 214; lisozima: 129. Menos do que 15% da molécula de lisozima está em contato com o fragmento Fab. (d) Resíduos que parecem entrar em contato com a lisozima incluem, na cadeia H: Gly³¹, Tyr³², Arg⁹⁹, Asp¹⁰⁰ e Tyr¹⁰¹; na cadeia L: Tyr³², Tyr⁴⁹, Tyr⁵⁰ e Trp⁹². Na lisozima, os resíduos Asn¹⁹, Gly²², Tyr²³, Ser²⁴, Lys¹¹⁶, Gly¹¹⁷, Thr¹¹⁸, Asp¹¹⁹, Gln¹²¹ e Arg¹²⁵ parecem estar situados na interface antígeno-anticorpo. Nem todos esses resíduos estão adjacentes na estrutura primária. O enovelamento do peptídeo em níveis estruturais mais elevados faz resíduos não consecutivos se combinarem para formar o sítio de ligação ao antígeno.

17. (a) Dois. (b) Absolutamente nenhum tempo. Antes de qualquer desafio pelo vírus, sempre existem anticorpos apropriados. (c) $> 10^8$. (d) São muitas as respostas possíveis.

18. (a)



O desenho não está em escala. A superfície de qualquer célula pode ter muito mais moléculas de miosina. (b) O ATP é necessário para suprir a energia química que impulsiona o movimento (ver Capítulo 13). (c) Um anticorpo que se ligue à cauda de miosina, o sítio de ligação para actina, pode bloquear a ligação com actina e impedir o movimento. Um anticorpo que se ligue à actina também pode impedir a interação actina-miosina e, consequentemente, o movimento. (d) Existem duas explicações possíveis: (1) A tripsina cliva apenas em resíduos Lys e Arg (ver Tabela 3-6) e, portanto, não cliva em muitos pontos da proteína. (2) Como nem todos os resíduos de Arg e Lys estão igualmente acessíveis à tripsina, os sítios mais expostos serão clivados primeiro. (e) O modelo S1. O modelo da dobradiça prediz que um complexo esfera-anticorpo-HMM (com a dobradiça) irá se mover, mas um complexo esfera-anticorpo-HMM (sem a dobradiça) não pode se mover. O modelo S1 prediz que ambos os complexos irão se mover porque ambos incluem S1. O achado de que a esfera se move sem SHMM (sem dobradiça) é consistente apenas com o modelo S1. (f) Com menos moléculas de

miosina ligadas, as esferas poderão temporariamente desligar da actina assim que mais miosina se liga. As esferas movem-se mais lentamente porque é preciso mais tempo para que uma segunda miosina se ligue. Uma maior densidade de miosina permite que assim que uma miosina sai outra se ligue imediatamente e, assim, o deslocamento será mais rápido. (g) A partir de uma certa densidade, o que limita a velocidade do deslocamento é a velocidade intrínseca com que as moléculas de miosina movem as esferas. As moléculas de miosina movem-se a uma velocidade máxima, e a adição de mais miosina não fará a velocidade aumentar. (h) Uma vez que a força é produzida na cabeça S1, danos nessa cabeça provavelmente inativarão a molécula e, então, SHMM será incapaz de produzir movimento. (i) A cabeça S1 deve permanecer coesa por meio de interações não covalentes que sejam fortes o suficiente para manter a molécula na sua forma ativa.

Capítulo 6

1. A atividade da enzima que converte açúcar em amido é destruída pela desnaturação por calor.

2. $2,4 \times 10^{-6}$ M

3. $9,5 \times 10^8$ anos

4. O complexo enzima-substrato é mais estável do que a enzima sozinha.

5. (a) 190 Å. (b) O enovelamento tridimensional da enzima aproxima os resíduos de aminoácidos.

6. A velocidade da reação pode ser medida acompanhando a diminuição na absorvância pelo NADH (em 340 nm) durante o correr da reação. Determinar o valor da K_m , usando concentrações de substrato bem maiores do que K_m , medir a velocidade inicial (velocidade do desaparecimento de NADH ao longo do tempo, espectrofotometricamente) em várias concentrações conhecidas das de enzima e fazer um gráfico de velocidade inicial *versus* a concentração da enzima. A curva deve ser linear, e a inclinação fornece uma medida da concentração de LDH.

7. (b), (e), (g)

8. (a) $1,7 \times 10^{-3}$ M. (b) 0,33, 0,67, 0,91. (c) A curva superior corresponde à enzima B ($[X] > K_m$ para essa enzima); a curva inferior corresponde à enzima A.

9. (a) $0,2 \mu\text{M s}^{-1}$. (b) $0,6 \mu\text{M s}^{-1}$. (c) $0,9 \mu\text{M s}^{-1}$.

10. (a) 2.000 s^{-1} . (b) Os valores medidos foram $V_{\max} = 1 \mu\text{M s}^{-1}$; $K_m = 2 \mu\text{M}$.

11. (a) 400 s^{-1} . (b) $10 \mu\text{M}$. (c) $\alpha = 2$, $\alpha' = 3$. (d) Inibidor misto.

12. (a) 24 nM. (b) $4 \mu\text{M}$ (V_0 é exatamente metade da V_{\max} , então $[A] = K_m$). (c) $40 \mu\text{M}$ (V_0 é exatamente metade da V_{\max} , então $[A] = 10$ vezes a K_m na presença do inibidor). (d) Não. $k_{\text{cat}}/K_m = (0,33 \text{ s}^{-1})/(4 \times 10^{-6} \text{ M}) = 8,25 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, muito abaixo do limite controlado pela difusão.

13. $V_{\max} \approx 140 \mu\text{M/min}$; $K_m \approx 1 \times 10^{-5} \text{ M}$

14. (a) $V_{\max} = 51,5 \text{ mM/min}$; $K_m = 0,59 \text{ mM}$. (b) Inibição competitiva.

15. $V_{\max} = 0,50 \mu\text{mol/min}$; $K_m = 2,2 \text{ mM}$.

16. Curva A.

17. $2,0 \times 10^7 \text{ min}^{-1}$

18. A suposição básica da equação de Michaelis-Menten permanece de pé. Esta reação está no estado estacionário e a velocidade é determinada por $V_0 = k_2[ES]$. As equações necessárias para resolver para $[ES]$ são

$$[E_t] = [E] + [ES] + [EI] \quad \text{e} \quad [EI] = \frac{[E][I]}{K_i}$$

$[E]$ pode ser obtida rearranjando a Equação 6-19. O resto segue o padrão da derivação da equação de Michaelis-Menten feita no texto.

19. 29.000. Os cálculos supõem que há apenas um resíduo essencial de Cys por molécula de enzima.

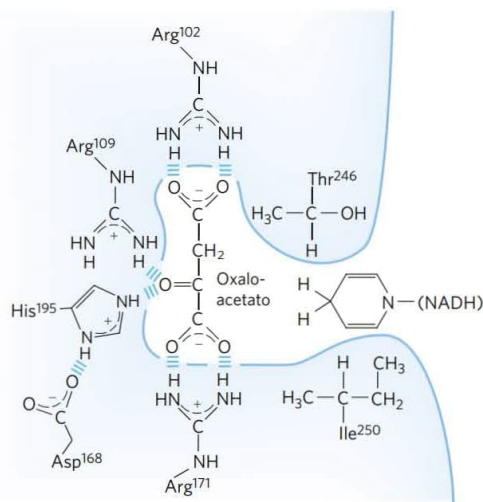
20. A atividade da enzima da próstata é igual ao total da atividade fosfatásica da amostra de sangue menos a atividade fosfatásica medida na presença de tartarato suficiente para inibir a enzima da próstata

21. A inibição é mista. Como K_m parece não mudar apreciavelmente, esse pode ser o caso especial de inibição mista denominada inibição não competitiva.

22. A $[S]$ na qual $V_0 = V_{\max}/2\alpha'$ é obtida quando todos os termos, à exceção de V_{\max} no lado direito da Equação 6-30 – (i.e., $[S]/(\alpha K_m + \alpha'[S])$ – forem iguais a $1/2\alpha'$. Começando com $[S]/(\alpha K_m + \alpha'[S]) = 1/2\alpha'$ e resolvendo para $[S]$.

23. A atividade ótima ocorre quando Glu^{35} está protonado, e Asp^{52} , desprotonado.

24. (a) Na enzima do tipo selvagem, o substrato é mantido no lugar por uma ligação de hidrogênio e uma interação íon-dipolo entre a cadeia carregada da Arg^{109} e a carbonila polar do piruvato. Durante a catálise, a cadeia lateral carregada da Arg^{109} também estabiliza a carbonila polarizada do estado de transição. Na enzima mutante, a ligação se reduz a apenas uma ligação de hidrogênio, a ligação com o substrato é fraca e a estabilização iônica do estado de transição é perdida, diminuindo a atividade catalítica. **(b)** Como Lys e Arg têm aproximadamente o mesmo tamanho e têm uma carga positiva semelhante, provavelmente, eles possuem propriedades semelhantes. Ainda mais, como o piruvato liga-se à Arg^{171} por (supostamente) uma interação iônica, espera-se que uma mutação de Arg para Lys tenha um efeito pequeno sobre a ligação com o substrato. **(c)** O arranjo em “garfo” alinha dois grupos carregados positivamente de resíduos de Arg com oxigênios carregados negativamente do piruvato, facilitando duas ligações de hidrogênio combinadas e interações íon-dipolo. Quando é Lys que está presente, é possível haver apenas uma dessas duas ligações de hidrogênio combinadas e interação íon-dipolo, o que reduz a intensidade da interação. O posicionamento do substrato é menos preciso. **(d)** Ile^{250} interage como o anel do NADH por meio de efeito hidrofóbico. Não é possível haver este tipo de interação com a cadeia lateral hidrofílica da Gln. **(e)** A estrutura está mostrada abaixo. **(f)** A enzima mutante rejeita o piruvato porque o grupo hidrofóbico metila do piruvato não interagiria com o grupo guanidina, altamente hidrofílico, da Arg^{102} . O mutante liga oxaloacetato devido à forte interação iônica entre a cadeia lateral da Arg^{102} e a carbonila do oxaloacetato. **(g)** A proteína deve ser flexível o suficiente para acomodar a cadeia lateral volumosa e o substrato maior.



Capítulo 7

1. Com a redução do grupo carbonila produzindo uma hidroxila, a química nos carbonos C-1 e C-3 é a mesma; a molécula de glicerol não é quiral.

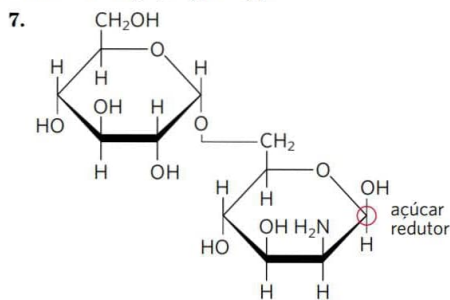
2. Epímeros diferem na configuração ao redor de apenas um carbono. **(a)** D-altrose (C-2), D-glicose (C-3), D-gulose (C-4). **(b)** D-idose (C-2), D-galactose (C-3), D-alose (C-4). **(c)** D-arabinose (C-2), D-xilose (C-3).

3. A formação de osazona destrói a configuração ao redor de C-2 de aldoses, de modo que aldoses que diferem apenas na configuração em C-2 produzem o mesmo derivado, com o mesmo ponto de fusão.

4. Para converter α -D-glicose em β -D-glicose, a ligação entre C-1 e a hidroxila em C-5 (como na Figura 7-6); para converter D-glicose em D-manose, a ligação com —H ou —OH em C-2. A conversão entre conformações em cadeia não requer quebra de ligações; essa é a diferença crítica entre configuração e conformação.

5. Não. A glicose e a galactose diferem em C-4.

6. (a) Ambos são polímeros da D-glicose, mas diferem na ligação glicosídica: ($\beta 1 \rightarrow 4$) para a celulose, ($\alpha 1 \rightarrow 4$) para o glicogênio. **(b)** Ambas são hexoses, mas a glicose é uma aldo-hexose, e a frutose é uma ceto-hexose. **(c)** Ambas são dissacarídeos, mas a maltose apresenta dois resíduos de glicose em ligação ($\alpha 1 \rightarrow 4$), e a sacarose possui D-glicose e D-frutose em ligação ($\alpha 1 \rightarrow 2\beta$).



8. Um hemiacetal é formado quando uma aldose ou cetose se condensa com um álcool; um glicosídeo é formado quando um hemiacetal se condensa com um álcool (ver Figura 7-5).

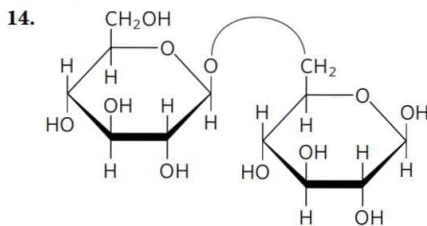
9. A frutose cicliza para uma estrutura de piranose ou de furanose. O aumento da temperatura desloca o equilíbrio no sentido da furanose, a forma menos doce.

10. A velocidade de mutarotação é suficientemente alta para que, na medida em que a enzima consome β -D-glicose, mais α -D-glicose seja convertida na forma β e, por fim, toda a glicose seja oxidada. A glicose-oxidase é específica para a glicose e não detecta outros açúcares redutores (como a galactose) que reagem com o reagente de Fehling.

11. Ferver uma solução de sacarose em água causa a hidrólise de parte da sacarose, formando o açúcar invertido. A hidrólise é acelerada e ocorre em temperaturas mais baixas com a adição de uma pequena quantidade de ácido (p. ex., suco de limão ou ácido tartárico).

12. Preparar uma pasta de sacarose e água; adicionar uma pequena quantidade de sacarase (invertase); imediatamente recobrir com chocolate.

13. A sacarose não possui um carbono anomérico livre para sofrer mutarotação.



Sim; sim.

15. A N-acetil- β -D-glicosamina é um açúcar redutor; seu C-1 pode ser oxidado (pp. 249-250). O D-gliconato não é um açúcar redutor; seu C-1 já está na forma mais oxidada de ácido carboxílico. A $\text{GlcN}(\alpha 1 \rightarrow 1\alpha)\text{Glc}$ não é um açúcar redutor; os carbonos anoméricos de ambos os monossacarídeos constituintes estão envolvidos na ligação glicosídica.

16. Os seres humanos não sintetizam celulase no trato gastrointestinal e não podem degradar a celulose.

17. A celulose nativa consiste em unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas ($\beta 1 \rightarrow 4$), o que força a cadeia do polímero a adotar uma conformação estendida. Séries paralelas dessas cadeias estendidas estabelecem ligações de hidrogênio intermoleculares, agregando-se em fibras longas, resistentes e insolúveis. O glicogênio consiste em unida-

des de glicose unidas por ligações glicosídicas ($\alpha 1 \rightarrow 4$), o que causa curvaturas na cadeia e impede a formação de fibras longas. Além disso, o glicogênio é altamente ramificado e, em função de muitos de seus grupos hidroxila estarem expostos à água, ele torna-se altamente hidratado e se dispersa em água.

A celulose é um material estrutural das plantas, consistente com sua agregação lado a lado em fibras insolúveis. O glicogênio é uma forma de armazenamento de combustível nos animais. Grânulos de glicogênio altamente hidratados com suas muitas extremidades não redutoras podem ser hidrolisados rapidamente pela glicogênio-fosforilase, liberando glicose-1-fosfato.

18. A celulose é diversas vezes maior; ela assume uma conformação estendida, ao passo que a amilose apresenta uma estrutura helicoidal.

19. 6.000 resíduos/s

20. 11 s

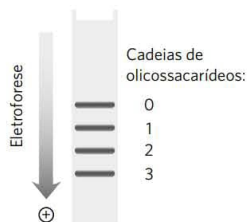
21. O modelo de bolas e bastões do dissacarídeo na Figura 7-18b não mostra interações estéricas, mas um modelo de preenchimento de espaço, mostrando todos os átomos com seus tamanhos relativos corretos, mostraria diversos obstáculos estéricos no conformero -170° , -170° que não estão presentes no conformero 30° , -40° .

22. As cargas negativas do condroitin-sulfato repelem-se umas às outras e forçam a molécula em uma conformação estendida. A molécula polar atrai muitas moléculas de água, aumentando o volume molecular. No sólido desidratado, cada carga negativa é contrabalançada por um íon positivo, e a molécula se condensa.

23. Resíduos de aminoácidos carregados positivamente se ligariam aos grupos carregados negativamente na heparina. De fato, resíduos de Lys da antitrombina III interagem com a heparina.

24. Oito sequências possíveis, 144 ligações possíveis e 64 possibilidades estereoquímicas, com um total de 73.728 permutações.

25.



26. Oligossacarídeos; suas subunidades podem ser combinadas de modos mais variados que os resíduos de aminoácidos em oligopeptídeos. Cada grupo hidroxila pode participar de ligações glicosídicas, e a configuração de cada ligação pode ser α ou β . O polímero pode ser linear ou ramificado.

27. (a) Resíduos nos pontos de ramificação produzem 2,3-di-*O*-metilglicose; resíduos não ramificados produzem 2,3,6-tri-*O*-metilglicose. **(b)** 3,75%.

28. Cadeias de resíduos de D-glicose em ligação (1 \rightarrow 6) com ocasionais ramificações (1 \rightarrow 3) e com uma ramificação a cada 20 resíduos, aproximadamente.

29. (a) Os testes envolvem tentar dissolver apenas parte da amostra em vários solventes e analisar o material dissolvido e o não dissolvido para ver se suas composições diferem. **(b)** Para uma substância pura, todas as moléculas são iguais e qualquer fração dissolvida terá a mesma composição que qualquer das frações não dissolvidas. Uma substância não pura é uma mistura de mais de um composto. Quando tratada com determinado solvente, a maior parte de um componente pode se dissolver, deixando a maior parte de outro(s) componente(s) não dissolvida. Como resultado, as frações dissolvida e não dissolvida terão composições diferentes. **(c)** Um ensaio quantitativo possibilita que os pesquisadores saibam que não foi perdida qualquer atividade durante a degradação. Quando se determina a estrutura de uma molécula, é importante que a amostra sob análise consista apenas de moléculas intactas (não degradadas). Se a amostra estiver contaminada com material resultante de degradação, ela dará resultados confusos e de difícil interpretação. Um ensaio qualitativo detectaria a presença de atividade, mesmo que o material apresentasse significativa degradação. **(d)** Resultados 1 e 2. O resul-

tado 1 é consistente com a estrutura conhecida, pois o antígeno do tipo B tem três resíduos de galactose; os tipos A e O têm apenas dois resíduos de galactose cada um. O resultado 2 é também consistente, pois o tipo A tem dois açúcares aminados (*N*-acetilgalactosamina e *N*-acetilglicosamina); os tipos B e O têm apenas um (*N*-acetilglicosamina). O resultado 3 não é consistente com a estrutura conhecida: para o tipo A, a razão glicosamina:galactosamina é 1:1; para o tipo B, é 1:0. **(e)** As amostras provavelmente não eram puras e/ou estavam parcialmente degradadas. Os dois primeiros resultados estavam corretos possivelmente porque o método não era rigorosamente quantitativo e, assim, sua sensibilidade era mais baixa, podendo haver imprecisões nas medidas. O terceiro resultado é mais quantitativo e, desse modo, mais facilmente iria diferir dos valores previstos devido a impurezas ou à degradação da amostra. **(f)** Uma exoglicosidase. Se fosse uma endoglicosidase, um dos produtos de sua ação sobre o antígeno O incluiria galactose, *N*-acetilglicosamina ou *N*-acetilgalactosamina, e pelo menos um desses açúcares seria capaz de inibir a degradação. Dado que a enzima não foi inibida por qualquer desses açúcares, deve ser uma exoglicosidase, removendo apenas o açúcar terminal da cadeia. O resíduo terminal do antígeno O é a fucose, de modo que a fucose é o único açúcar capaz de inibir a degradação do antígeno O. **(g)** A exoglicosidase remove *N*-acetilgalactosamina do antígeno A e galactose do antígeno B. Uma vez que a fucose não é um produto de qualquer dessas reações, ela não inibirá a remoção desses açúcares, e as substâncias resultantes não mais serão ativas como antígeno A ou B. Contudo, os produtos seriam ativos no caso do antígeno O, pois a degradação cessa na fucose. **(h)** Todos os resultados são consistentes com a Figura 10-14. (1) D-Fucose e L-galactose, que protegeriam contra degradação, não estão presentes em qualquer dos antígenos. (2) O açúcar terminal do antígeno A é a *N*-acetilgalactosamina, e apenas ele protege este antígeno da degradação. (3) O açúcar terminal do antígeno B é a galactose, que é o único açúcar capaz de proteger este antígeno.

Capítulo 8

1. N-3 e N-7.

2. (5')GCGCAATATTTTGAGAAATATTGCGC(3'), e contém um palíndromo. As cadeias individuais podem formar estruturas em grampo; as duas cadeias podem formar um cruciforme.

3. $9,4 \times 10^{-4}$ g

4. (a) 40° . **(b)** 0° .

5. A hélice de RNA está na conformação A; a hélice de DNA geralmente está na conformação B.

6. No DNA de eucariotos, cerca de 5% dos resíduos de C estão metilados. A 5-metilcitosina pode desaminar espontaneamente para formar timina; o par G-T resultante é uma das incompatibilidades mais comuns nas células eucarióticas.

7. Mais alto.

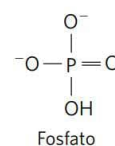
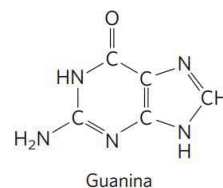
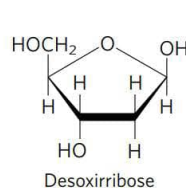
8. Sem a base, o anel de ribose pode ser aberto para gerar a forma aldeídica não cíclica. Isso, e a perda de interações de empilhamento de bases, podem contribuir significativamente para a flexibilidade do esqueleto de DNA.

9. GCGCGTGC GCGCGCG

10. O empilhamento de bases em ácidos nucleicos tende a reduzir a absorção de luz UV. A desnaturação envolve perda de empilhamento de bases e aumento de absorção da UV.

11. 0,35 mg/mL

12.



Solubilidades: fosfato > desoxirribose > guanina. Os grupos fosfato altamente polares e as porções de açúcar estão na parte externa da dupla-hélice, expostos à água; as bases hidrofóbicas estão no interior da hélice.

13. Oligonucleotídeo iniciador 1: CCTCGAGTCAATCGATGCTG

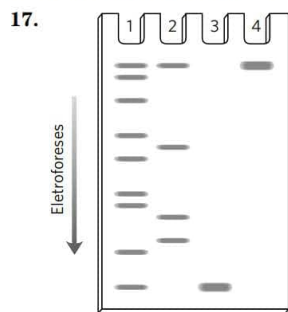
Oligonucleotídeo iniciador 2: CGCGCACATCAGACGAACCA

Lembre-se de que todas as sequências de DNA estão escritas na direção 5'→3', da esquerda para a direita; que DNA-polimerase sintetiza DNA na direção 5'→3'; que os dois filamentos de uma molécula de DNA são antiparalelos; e que ambos os iniciadores de PCR têm como alvo o final das sequências, de modo que as suas extremidades 3' estejam orientadas para o segmento a ser amplificado.

14. Os iniciadores podem ser usados para hibridizar com bibliotecas contendo clones genômicos longos, a fim de identificar as extremidades dos contigs que estejam próximas umas das outras. Se os contigs que flanqueiam a lacuna estiverem próximos o suficiente, os iniciadores podem ser usados em PCR para amplificar diretamente o DNA interveniente que separa os contigs, que podem, então, ser clonados e sequenciados.

15. O 3'-H impediria a adição de quaisquer nucleotídeos subsequentes, de forma que a sequência de cada *cluster* terminaria após a adição do primeiro nucleotídeo.

16. Se o dCTP for omitido, quando o primeiro resíduo G for encontrado no molde, o ddCTP será adicionado, e a polimerização será interrompida. Apenas uma banda será vista no gel de sequenciamento.



18. (5')P—GCGCCAUUGC(3')—OH
 (5')P—GCGCCAUUG(3')—OH
 (5')P—GCGCCAU(3')—OH
 (5')P—GCGCCAU(3')—OH
 (5')P—GCGCCA(3')—OH
 (5')P—GCGCC(3')—OH
 (5')P—GCGC(3')—OH
 (5')P—GCG(3')—OH
 (5')P—GC(3')—OH

e os nucleosídeos 5'-fosfato.

19. (a) A água é um participante da maioria das reações biológicas, incluindo aquelas que causam mutações. O baixo conteúdo de água nos endósporos reduz a atividade das enzimas causadoras de mutações e diminui a taxa de reações de despurinação não enzimáticas, que são reações de hidrólise. (b) A luz UV induz a formação de dímeros de pirimidina de ciclobutano. Como o *B. subtilis* é mais fácil argumentar que os esporos podem ser depositados no topo do solo ou no ar, onde podem estar sujeitos à exposição prolongada aos raios UV.

20. O DMT é um grupo bloqueador que impede a reação da base que está sendo adicionada com ela mesma.

21. (a) Orientada para a direita. A base em uma extremidade 5' é a adenina; na outra extremidade 5', é a citosina. (b) Orientada para a esquerda. (c) Se você não puder ver as estruturas em estereó, use um mecanismo de busca para encontrar dicas *on-line*.

22. (a) Não é fácil! Os dados para amostras diferentes do mesmo organismo mostram uma variação significativa e a recuperação nunca é 100%. Os números para C e T mostram muito mais consistência do que para A e G, então para C e T é muito mais fácil argumentar que amostras do mesmo organismo têm a mesma composição. Mas mesmo com os valores menos consistentes para A e G, (1) a faixa de valores para diferentes tecidos se sobrepõe substancialmente; (2) a diferença entre preparações diferentes do mesmo tecido é aproximadamente a

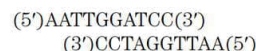
mesma que a diferença entre amostras de tecidos diferentes; e (3) em amostras para as quais a recuperação é alta, os números são mais consistentes. (b) Esta técnica não seria sensível o suficiente para detectar uma diferença entre células normais e cancerígenas. O câncer é causado por mutações, mas essas mudanças no DNA, alguns pares de bases de vários bilhões, seriam pequenas demais para serem detectadas com essas técnicas. (c) As razões de A:G e T:C variam amplamente entre as diferentes espécies. Por exemplo, na bactéria *Serratia marcescens*, ambas as razões são 0,4, isto é, o DNA contém principalmente G e C. Na *Haemophilus influenzae*, por outro lado, as razões são 1,74 e 1,54, significando que a maioria do DNA é composta por A e T. (d) A conclusão 4 tem três requisitos. (1) A = T: a tabela mostra uma relação A:T muito próxima de 1 em todos os casos. Certamente, a variação nesta proporção é substancialmente menor que a variação nas razões A:G e T:C. (2) G = C: novamente, a relação G:C é muito próxima a 1 e as outras razões variam muito. (3) A + G = T + C: essa é a relação purina:pirimidina, que também é muito próxima de 1. (e) As diferentes frações do “cerne” representam diferentes regiões do DNA do germe de trigo. Se o DNA fosse uma sequência repetitiva monótona, a composição básica de todas as regiões seria a mesma. Uma vez que regiões diferentes do cerne têm sequências diferentes, a sequência de DNA deve ser mais complexa.

Capítulo 9

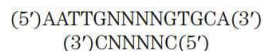
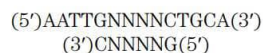
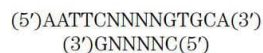
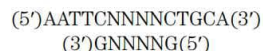
1.

- (a) (5') --- G(3') e (5')AATTC --- (3')
 (3') --- CTAA(5') (3') G --- (5')
- (b) (5') --- GAATT(3') e (5')AATTC --- (3')
 (3') --- CTAA(5') (3')TTAAG --- (5')
- (c) (5') --- GAATTAATTC --- (3')
 (3') --- CTTAATTAAG --- (5')
- (d) (5') --- G(3') e (5')C --- (3')
 (3') --- C(5') (3')G --- (5')
- (e) (5') --- GAATTC --- (3')
 (3') --- CTTAAG --- (5')
- (f) (5') --- CAG(3') e (5')CTG --- (3')
 (3') --- GTC(5') (3')GAC --- (5')
- (g) (5') --- CAGAATTC --- (3')
 (3') --- GTCTTAAG --- (5')

(h) Método 1: cortar o DNA com EcoRI como em (a), tratar o DNA como em (b) ou (d) e, então, ligar um fragmento de DNA sintético com a sequência de reconhecimento BamHI entre as duas pontas cegas resultantes. Método 2 (mais eficiente): sintetizar um fragmento de DNA com a estrutura



Isso ligaria de maneira eficiente às extremidades coesivas geradas pela clivagem de EcoRI, introduziria um sítio BamHI, mas não regeneraria o sítio EcoRI. (i) Os quatro fragmentos (com N = qualquer nucleotídeo), na ordem de discussão no problema, são.



2. Cromossomos artificiais de levedura (YACs) não são estáveis em uma célula a menos que tenham duas extremidades contendo telômeros e um grande segmento de DNA clonado no cromossomo. Os YACs com menos de 10.000 pb são perdidos em pouco tempo durante a mitose continuada e a divisão celular.

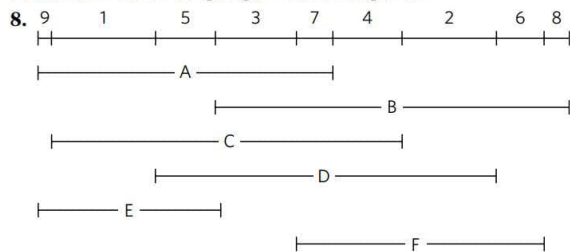
3. (a) Plasmídeos nos quais o pBR322 original foi regenerado sem inserção de um fragmento de DNA exógeno; estes manteriam resistência à ampicilina. Além disso, duas ou mais moléculas de pBR322 podem ser ligadas juntas com ou sem inserção de DNA exógeno. **(b)** Os clones nas canaletas 1 e 2 têm, cada um, um fragmento de DNA inserido em diferentes orientações. O clone na canaleta 3 tem dois fragmentos de DNA, ligados de modo que as extremidades proximais de EcoRI estão unidas.

4. (5')GAAAGTCCGCGTTATAGGCATG(3')
(3')ACGTCCTTCAGGCGCAATATCCGTACTTAA(5')

5. Seu teste exigiria *primers* de DNA, uma DNA-polimerase resistente ao calor, desoxinucleosídeos trifosfatados e uma máquina de PCR (termociclador). Os *primers* seriam projetados para amplificar um segmento de DNA abrangendo a repetição CAG. A fita de DNA mostrada é a fita codificadora, orientada no sentido 5'→3', da esquerda para a direita. O *primer* cujo alvo seria o DNA à esquerda da repetição seria idêntico a qualquer sequência de 25 nucleotídeos mostrada na região à esquerda da repetição CAG. O *primer* para o lado direito deve ser complementar e antiparalelo a uma sequência de 25 nucleotídeos à direita da repetição CAG. Usando os *primers*, o DNA incluindo a repetição CAG seria amplificado por PCR, e seu tamanho seria determinado por comparação com os marcadores de tamanho conhecidos após a eletroforese. O comprimento do DNA refletiria o comprimento da repetição CAG, fornecendo um teste simples para a doença.

6. Desenhe *primers* de PCR que sejam complementares ao DNA no segmento deletado, mas que direcionariam a síntese de DNA em direções opostas um do outro. Nenhum produto de PCR é produzido, a não ser que as extremidades do segmento excluído sejam unidas para criar um círculo.

7. A planta que expressa a luciferase do vaga-lume deve absorver a luciferina, o substrato da luciferase, antes que ela possa “brilhar” (embora fracamente). A planta que expressa a proteína fluorescente verde brilha sem a necessidade de qualquer outro composto.



9. A produção de anticorpos marcados é difícil e cara, e a marcação de cada anticorpo para cada proteína-alvo seria impraticável. Marcando uma preparação de anticorpo para ligação a todos os anticorpos de uma classe específica, a mesma preparação de anticorpo marcado pode ser utilizada em muitos diferentes experimentos de imunofluorescência.

10. Expresse a proteína na cepa de levedura 1 como uma proteína de fusão com um dos domínios de Gal4p – digamos, o domínio de ligação ao DNA. Utilizando a cepa de levedura 2, faça uma biblioteca em que essencialmente todas as proteínas do fungo são expressas como uma proteína de fusão com o domínio de interação de Gal4p. Faça o cruzamento da cepa 1 com a biblioteca da cepa 2 e procure colônias que são coloridas devido à expressão do gene repórter. Essas colônias geralmente surgem de células acopladas contendo uma proteína de fusão que interage com a proteína-alvo.

11. Cobrir o ponto 4, adicionar solução contendo T ativado, irradiar, lavar.

1. A–T 2. G–T 3. A–T 4. G–C

Cobrir os pontos 2 e 4, adicionar solução contendo G ativado, irradiar, lavar.

1. A–T–G 2. G–T 3. A–T–G 4. G–C

Cobrir o ponto 3, adicionar solução contendo C ativado, irradiar, lavar.

1. A–T–G–C 2. G–T–C 3. A–T–G 4. G–C–C

Cobrir os pontos 1, 3 e 4, adicionar solução contendo C ativado, irradiar, lavar.

1. A–T–G–C 2. G–T–C–C 3. A–T–G 4. G–C–C

Cobrir os pontos 1 e 2, adicionar solução contendo G ativado, irradiar, lavar.

1. A–T–G–C 2. G–T–C–C 3. A–T–G–G 4. G–C–C–G

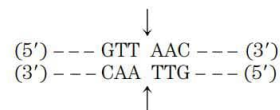
12. ATSAAGWDEWEGGKVLHLDGKLNQNGALLELDIGAV

13. O padrão de haplótipos nas populações aleúte e esquimó sugere que a migração de seus ancestrais para as regiões do Ártico americano foi separada das migrações que eventualmente povoaram o restante da América do Norte e do Sul.

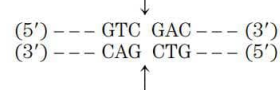
14. O cruzamento entre os Denisovans e o *Homo sapiens* deve ter ocorrido na Ásia, em algum momento nos muitos milênios durante os quais os seres humanos migraram da África para a Ásia e depois para a Austrália e a Melanésia.

15. A mesma condição de doença pode ser causada por defeitos em dois ou mais genes que estão em cromossomos diferentes.

16. (a) As soluções de DNA são altamente viscosas porque as moléculas muito longas estão emaranhadas em solução. Moléculas mais curtas tendem a se emaranhar menos e formam uma solução menos viscosa, então a viscosidade diminuída corresponde ao encurtamento dos polímeros – como causado pela atividade nucleásica. **(b)** Uma endonuclease. Uma exonuclease remove nucleotídeos da extremidade 5' ou 3' e produziria nucleotídeos marcados com ^{32}P solúveis em TCA. Uma endonuclease corta o DNA em fragmentos de oligonucleotídeos e produz pouco ou nenhum material marcado com ^{32}P solúvel em TCA. **(c)** A extremidade 5'. Se o fosfato fosse mantido na extremidade 3', a cinase incorporaria uma quantidade significativa de ^{32}P à medida que adicionasse fosfato à extremidade 5'; o tratamento com a fosfatase não teria efeito sobre isso. Neste caso, as amostras A e B incorporariam quantidades significativas de ^{32}P . Quando o fosfato é mantido na extremidade 5', a cinase não incorpora nenhum ^{32}P : ela não pode adicionar um fosfato quando já existe fosfato presente. O tratamento com a fosfatase remove o fosfato da extremidade 5', e a cinase incorpora quantidades significativas de ^{32}P . A amostra A terá pouco ou nenhum ^{32}P , e a B mostrará incorporação substancial de ^{32}P – como observado. **(d)** Quebras aleatórias produziram uma distribuição de fragmentos de tamanhos aleatórios. A produção de fragmentos específicos indica que a enzima é sítio-específica. **(e)** Clivagem no sítio de reconhecimento. Isso produz uma sequência específica na extremidade 5' dos fragmentos. Se a clivagem ocorresse perto, mas não dentro do sítio de reconhecimento, as sequências nas extremidades 5' dos fragmentos seria aleatória. **(f)** Os resultados são consistentes com duas sequências de reconhecimento, como mostrado abaixo, clivadas conforme indicado pelas setas:



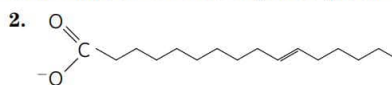
que produz os fragmentos (5')pApApC e (3')TpTp; e



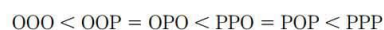
que produz os fragmentos (5')pGpApC e (3')CpTp.

Capítulo 10

1. O termo “lípeido” não especifica uma determinada estrutura química. Compostos são caracterizados como lípeidos com base em sua maior solubilidade em solventes orgânicos que em água.



3. (a) O número de ligações duplas *cis*. Cada ligação dupla *cis* determina uma dobra na cadeia hidrocarbonada, diminuindo a temperatura de fusão. **(b)** Seis diferentes triacilgliceróis podem ser construídos, em ordem de pontos de fusão crescentes:



em que O = ácido oleico e P = ácido palmítico. Quanto maior o conteúdo de ácidos graxos saturados, maior o ponto de fusão. **(c)** Ácidos graxos com cadeia ramificada aumentam a fluidez das membranas, pois diminuem o grau de empacotamento lipídico na membrana.

4. A hidrogenação reduz o número de ligações duplas, o que aumenta o ponto de fusão dos lipídeos contendo os ácidos graxos.

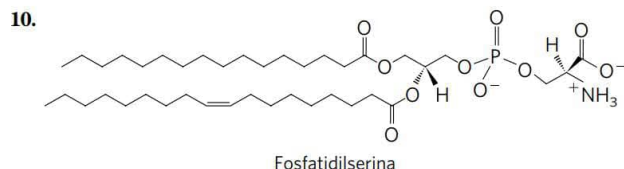
5. Cadeias acila longas e saturadas, praticamente sólidas em temperatura ambiente, formam uma camada hidrofóbica na qual um composto polar, como a H_2O , não pode se dissolver ou difundir.

6. Hortelã é (*R*)-carvona; cominho é (*S*)-carvona.



8. **Unidades hidrofóbicas:** (a) 2 ácidos graxos; (b), (c) e (d) 1 ácido graxo e a cadeia hidrocarbonada da esfingosina; (e) o núcleo esteroide e cadeia lateral acila. **Unidades hidrofílicas:** (a) fosfoetanolamina; (b) fosfocolina; (c) D-galactose; (d) diversas moléculas de açúcares; (e) grupo álcool ($-\text{OH}$).

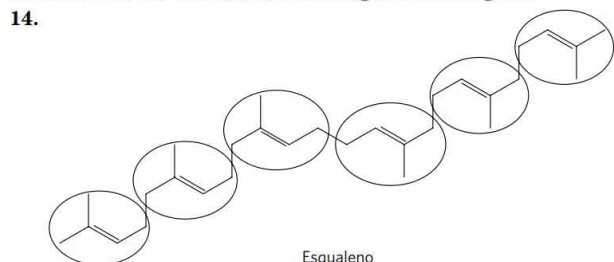
9. Poderia apenas ser um esfingolípido (esfingomielina).



11. A porção do lipídeo de membrana que determina o tipo sanguíneo é o oligossacarídeo na cabeça polar de esfingolípídeos de membrana (ver Figura 10-14). Esse mesmo oligossacarídeo está ligado a certas glicoproteínas de membrana, que também servem como pontos de reconhecimento para anticorpos que distinguem os grupos sanguíneos.

12. (a) O grupo $-\text{OH}$ livre em C-2 e o grupo que fosfocolina que constitui a cabeça polar em C-3 são hidrofílicos; o ácido graxo em C-1 na molécula da lisolecitina é hidrofóbico. (b) Certos esteroides, como, por exemplo, a prednisona, inibem a ação da fosfolipase A_2 , inibindo a liberação de ácido araquidônico a partir do C-2. O ácido araquidônico é convertido em uma variedade de eicosanoides, alguns dos quais causadores de inflamação e dor. (c) A fosfolipase A_2 libera ácido araquidônico, um precursor de outros eicosanoides com funções vitais na proteção do organismo; ela também degrada glicerofosfolípídeos da dieta.

13. O diacilglicerol é hidrofóbico e permanece na membrana. O inositol 1,4,5-trisfosfato é altamente polar, muito solúvel em água e difunde-se mais facilmente no citosol. Ambos são segundos mensageiros.



15. (a) Glicerol e sais de palmitato de sódio e estearato de sódio. (b) D-Glicerol 3-fosfocolina e sais de palmitato de sódio e oleato de sódio.

16. Solubilidade em água: monoacilglicerol > diacilglicerol > triacilglicerol.

17. Do primeiro para o último eluado: palmitato de colesterol e triacilglicerol; colesterol e *n*-tetradecanol; fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina; esfingomielina; fosfatidilserina e palmitato.

18. (a) Aplicar o hidrolisado ácido de cada composto em uma cromatografia (gasosa ou CCD em uma placa de sílica-gel) e comparar o resultado com padrões conhecidos. *Hidrolisado de esfingomielina:* esfingosina, ácidos graxos, fosfocolina, colina e fosfato; *hidrolisado de cerebrosideo:* esfingosina, ácidos graxos, açúcares, mas não fosfato. (b) A hidrólise alcalina forte da esfingomielina produz esfingosina; a hidrólise da fosfatidilcolina produz glicerol. Detectar componentes do hidrolisado em cromatografia de camada delgada pela comparação com padrões ou por sua ação distinta com FDNB (apenas a esfingosina reage, formando um produto corado). O tratamento com fosfolipase A_1 ou A_2 libera ácidos graxos livres a partir da fosfatidilcolina, mas não da esfingomielina.

19. Fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina.

20. (a) GM1 e globosídeo. Ambas, glicose e galactose, são hexoses, de modo que "hexose" na razão molar se refere a glicose + galactose. As razões: GM1, 1:3:1:1; GM2, 1:2:1:1; GM3, 1:2:0:1; globosídeo, 1:3:1:0. (b) Sim. A razão equivale a GM2, o gangliosídeo que se espera estar aumentado na doença de Tay-Sachs (ver Quadro 10-1, Figura Q-1). (c) Essa análise é similar àquela usada por Sanger para determinar a sequência de aminoácidos da insulina. A análise de cada fragmento revela apenas sua *composição*, não sua *sequência*; contudo, uma vez que cada fragmento é formado pela remoção sequencial de um açúcar, podemos tirar conclusões acerca da sequência. A estrutura do asialogangliosídeo normal é ceramida-glicose-galactose-galactosamina-galactose, consistente com o Quadro 10-1 (excluindo-se Neu5Ac, removido anteriormente à hidrólise). (d) O asialogangliosídeo de Tay-Sachs é ceramida-glicose-galactose-galactosamina, consistente com o Quadro 10-1. (e) A estrutura do asialogangliosídeo normal, GM1, é: *ceramida-glicose* [2 $-\text{OH}$ envolvida em ligações glicosídicas; 1 $-\text{OH}$ envolvida na estrutura do anel; 3 $-\text{OH}$ (2, 3, 6) livres para metilação]-*galactose* [2 $-\text{OH}$ em ligações; 1 $-\text{OH}$ no anel; 3 $-\text{OH}$ (2, 4, 6) livres para metilação]-*galactosamina* [2 $-\text{OH}$ em ligações; 1 $-\text{OH}$ no anel; 1 $-\text{NH}_2$ em vez de $-\text{OH}$; 2 $-\text{OH}$ (4, 6) livres para metilação]-*galactose* [1 $-\text{OH}$ em ligações; 1 $-\text{OH}$ no anel; 4 $-\text{OH}$ (2, 3, 4, 6) livres para metilação]. (f) Duas peças-chave de informação estão faltando: quais são as ligações entre os açúcares? Onde está ligado o Neu5Ac?

Capítulo 11

1. A área por molécula pode ser calculada sabendo-se a quantidade (número de moléculas) de lipídeos usados e a área ocupada pela monocamada quando ela começa a resistir à compressão (quando a força necessária aumenta significativamente, como pode ser visto em gráficos de força *versus* área).

2. Os dados de eritrócitos de cachorro suportam a ideia de uma bicamada lipídica. Uma única célula, com $98 \mu\text{m}^2$, teria uma monocamada com uma área de $200 \mu\text{m}^2$. No caso de eritrócitos de seres humanos e de ovelhas, os dados sugerem a existência de uma monocamada, e não de uma bicamada. Na verdade, nesses experimentos ocorreram erros experimentais significativos. Medições recentes mais acuradas suportam a ideia da existência de uma bicamada em todos os casos.

3. 63

4. (a) Os lipídeos que formam bicamadas são moléculas anfipáticas, as quais contêm uma região hidrofílica e uma região hidrofóbica. Esses lipídeos, para minimizar a área hidrofóbica exposta para a superfície de água, formam lâminas bidimensionais com as regiões hidrofílicas expostas para a água e as regiões hidrofóbicas enterradas no interior da folha. Além disso, para evitar a exposição das margens hidrofóbicas da lâmina para a água, os lipídeos da bicamada selam-se neles mesmos. (b) Essas lâminas formam a superfície fechada das membranas que envelopam os compartimentos intracelulares (organelas).

5. 2 nm. Dois palmitatos enfileirados têm 4 nm de comprimento, aproximadamente a espessura de uma bicamada típica.

6. A extração por sal indica uma localização periférica, e a inacessibilidade a proteases nas células intactas indica uma localização interna. X parece ser uma proteína periférica da face citosólica da membrana.

7. Construa um gráfico de hidropatia. As regiões hidrofóbicas com 20 ou mais resíduos de aminoácidos sugerem que seja um segmento transmembrana. Determine se, no eritrócito intacto, a proteína reage com reagentes para aminas primárias, aos quais ela é impermeável. Se reagir é porque o aminoterminal do transportador está localizado para o lado externo da célula.

8. Aproximadamente 1%; estimado calculando-se a área da superfície da célula e 10.000 moléculas de transportador (usando as dimensões da hemoglobina [5,5 nm de diâmetro, p. 163] como modelo de proteína globular).

9. Aproximadamente 22. Para estimar a fração de superfície de membrana coberta por fosfolípidos, deve-se saber (ou estimar) a área média da seção transversal de uma molécula de fosfolípido na bicamada (i.e., a partir de experimentos semelhantes ao apresentado no diagrama do Problema 1 deste capítulo) e a área média da seção transversal de uma proteína de 50 kDa.

10. A velocidade de difusão diminuirá. A movimentação de moléculas individuais de lípidos da bicamada é muito maior a 37°C, quando os lípidos estão em fase “fluida”, do que a 10°C, quando eles estão em fase “sólida”. Esse efeito é mais pronunciado do que a diminuição no movimento browniano decorrente da diminuição da temperatura.

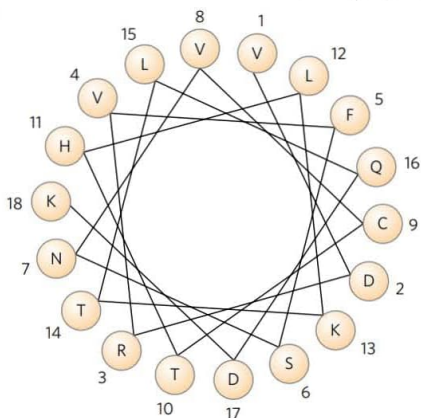
11. As interações entre os lípidos de membrana devem-se ao efeito hidrofóbico, não covalente e reversível, o que permite que as membranas possam se resselar.

12. A temperatura dos tecidos das extremidades do corpo é menor do que a dos tecidos mais próximos ao centro do corpo. Se o lípido deve permanecer fluido nessas temperaturas menores, ele deve ter uma proporção maior de ácidos graxos insaturados. Os ácidos graxos insaturados diminuem o ponto de fusão das misturas de lípidos.

13. O custo energético para movimentar o grupo altamente polar e algumas vezes carregado da cabeça do lípido para o interior hidrofóbico da bicamada é proibitivo.

14. Em pH 7, o triptofano possui uma carga positiva e uma carga negativa, mas o indol não é carregado. O movimento do indol, menos polar, através do núcleo hidrofóbico da bicamada é energeticamente mais favorável.

15.



Os aminoácidos com maior índice de hidropatia (V, L, F e C) ficam agrupados em um dos lados da hélice. É mais fácil que essa hélice anfipática fique com a sua superfície hidrofóbica mergulhada na bicamada enquanto a sua outra superfície fica exposta à fase aquosa. De modo alternativo, um grupo de hélices pode se agrupar com as superfícies polares em contato umas com as outras e as superfícies hidrofóbicas de frente para a bicamada lipídica.

16. 35 kJ/mol, desprezando os efeitos do potencial elétrico transmembrana; 0,60 mol.

17. 13 kJ/mol

18. A maior parte do O_2 que um tecido consome é para a fosforilação oxidativa, a fonte da maior parte do ATP. Portanto, cerca de dois terços do ATP sintetizado pelos rins é usado para bombear K^+ e Na^+ .

19. Não. O importador pode carrear mais do que um equivalente de Na^+ para cada glicose transportada.

20. Trate uma suspensão de células com NEM não marcado na presença de excesso de lactose, remova a lactose e, então, adicione NEM marcado radioativamente. Use SDS-PAGE para determinar a M_r da banda radioativa (o transportador).

21. O transportador de leucina é específico para o isômero L, mas o sítio de ligação pode acomodar tanto L-leucina quanto L-valina. A redução da

V_{\max} na presença de Na^+ indica que a leucina (ou valina) é transportada pelo simporte com Na^+ .

22. A V_{\max} é reduzida; K_t não é afetada.

23. 3×10^{-2} s

24. (a) Glicoforina A: 1 segmento transmembrana; mioglobina; nenhum segmento comprido o suficiente para cruzar a membrana (não é uma proteína de membrana); aquaporina: 6 segmentos transmembrana (a proteína pode ser um canal ou um receptor de membrana). (b) A janela de 15 resíduos tem uma relação sinal-ruído melhor. (c) Uma janela mais estreita reduz o impacto dos “efeitos das bordas” quando a sequência transmembrana está próxima de uma das extremidades da proteína.

25. (a) O incremento que cada resíduo dá para a α -hélice (Capítulo 4) é cerca de $1,5 \text{ \AA} = 0,15 \text{ nm}$. Para cruzar uma bicamada de 4 nm de espessura, uma α -hélice deve conter cerca de 27 resíduos e, portanto, para que haja sete segmentos atravessando a membrana são necessários cerca de 190 resíduos de aminoácidos. Uma proteína de M_r 64.000 tem cerca de 580 resíduos. (b) Gráficos de hidropatia são usados para localizar regiões transmembrana. (c) Como cerca de metade dessa parte do receptor é formada por resíduos de aminoácidos carregados, ela provavelmente representa uma alça intracelular que conecta duas regiões adjacentes que atravessam a membrana. (d) Essa região do receptor provavelmente é uma das regiões da proteína que atravessam a membrana, pois essa hélice é composta predominantemente por resíduos hidrofóbicos.

26. (a) Suporta o *Modelo A*. As duas linhas escuras são ou camadas de proteínas ou cabeças de fosfolípidos, e os espaços claros são ou a bicamada ou o núcleo hidrofóbico, respectivamente. Não suporta o *Modelo B*. Esse modelo necessita de uma banda mais ou menos uniformemente corada rodeando a célula. Suporta o *Modelo C*, com uma restrição. As duas linhas escuras são cabeças de fosfolípidos, e a zona clara são as caudas. Isso supõe que as proteínas de membrana não são visíveis, uma vez que elas não são coradas com ósmio ou então não estão nas seções observadas. (b) Suporta o *Modelo A*. As duas linhas escuras. Uma bicamada “nua” (4,5 nm) + duas camadas de proteínas (2 nm) perfazem 6,5 nm, o que está dentro da faixa de espessura observada. O *Modelo B* também não. Esse modelo inclui previsões sobre a espessura da membrana. Suporta o *Modelo C*. É difícil conciliar esse resultado com o modelo, que prevê uma membrana mais espessa, ou algo mais espessa do que uma bicamada “nua”, devido às protuberâncias das proteínas incrustadas. Esse modelo é compatível apenas se os menores valores para a espessura da membrana estiverem corretos e se uma quantidade substancial de proteínas protunda da bicamada. (c) Indefinido para o *Modelo A*. É difícil conciliar este resultado com o modelo. Caso as proteínas estejam ligadas à membrana por interações iônicas, o modelo prevê que a proteína tem uma grande proporção de aminoácidos carregados, o contrário do que foi observado. Também, como a camada proteica deve ser muito fina (ver (b)) não haveria muito espaço para um núcleo proteico hidrofóbico, e os resíduos hidrofóbicos deveriam estar expostos ao solvente. Suporta o *Modelo B*. As proteínas são formadas por uma mistura de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (interagindo com os lípidos) e resíduos carregados (interagindo com a água). Suporta o *Modelo C*. As proteínas são formadas por uma mistura de aminoácidos com resíduos hidrofóbicos (ancorados na membrana) e resíduos carregados (interagindo com a água). (d) Indefinido para o *Modelo A*. É muito difícil reconciliar com esse modelo, pois ele prevê uma proporção de exatamente 2,0 e isso é difícil de ser alcançado sob pressões fisiologicamente relevantes. O *Modelo B* também não. Esse modelo não faz previsões sobre a quantidade de lípidos na membrana. Suporta o *Modelo C*. Algumas superfícies de membrana são tomadas por proteínas, e, assim, a relação pode ser menor do que 2,0, o que é observado em condições fisiologicamente relevantes. (e) Indefinido para o *Modelo A*. O modelo prevê que as proteínas estejam em conformações estendidas, em vez de globulares, de modo que seria compatível apenas supondo que as proteínas estejam em camadas na superfície, incluindo segmentos em hélice. Suporta o *Modelo B*. O modelo prevê haver predomínio de proteínas globulares (contendo alguns segmentos em hélice). Suporta o *Modelo C*. O modelo prevê haver predomínio de proteínas globulares. (f) Indefinido para o *Modelo A*. Os grupos de cabeça de fosforilamina ficam protegidos pela camada de proteína e somente se as proteínas cobrirem completamente a superfície os fosfolípidos ficam completamente protegidos da fosfolipase. Suporta o *Modelo*

B. A maioria dos grupos da cabeça está acessível à fosfolipase. Suporta o *Modelo C*. Todos os grupos da cabeça estão acessíveis à fosfolipase. (g) Não suporta o *Modelo A*. As proteínas estão completamente acessíveis para a digestão por tripsina e, virtualmente, todas sofrem muitas clivagens, pois os segmentos hidrofóbicos não estão protegidos. Não suporta o *Modelo B*. Praticamente todas as proteínas da bicamada estão inacessíveis à tripsina. Suporta o *Modelo C*. Os segmentos da proteína que penetram ou atravessam a bicamada ficam protegidos da tripsina e os que estão expostos nas superfícies são clivados. As partes que são resistentes à tripsina têm uma alta proporção de resíduos hidrofóbicos.

Capítulo 12

1. X é cAMP; a sua produção é estimulada por adrenalina. (a) A centrifugação sedimenta a adenilil-ciclase (que catalisa a formação de cAMP) na fração particulada. (b) A adição de cAMP estimula a glicogênio-fosforilase. (c) cAMP é termolábil; pode ser preparado tratando ATP com hidróxido de bário.
2. Ao contrário do cAMP, dibutilil-cAMP passa facilmente pela membrana plasmática.
3. (a) Ela aumenta a [cAMP]. (b) cAMP regula a permeabilidade de Na^+ . (c) Repor os fluidos e eletrólitos perdidos.
4. (a) A mutação deixa R incapaz de ligar e inibir C, e, então, C permanece constantemente ativo. (b) A mutação evita que cAMP se ligue a R, deixando C inibido pelo R ligado.
5. Albuterol aumenta a [cAMP], levando ao relaxamento e à dilatação dos brônquios e dos bronquíolos. Devido ao fato de que os receptores β -adrenérgicos controlam muitos processos, poderão ter efeitos colaterais indesejáveis. Para minimizar esses efeitos, encontre um agonista específico para o subtipo de receptor β -adrenérgico presente no músculo liso dos brônquios.
6. Degradação do hormônio; hidrólise do GTP ligado à proteína G; degradação, metabolização ou sequestro do segundo mensageiro; dessensibilização do receptor; remoção do receptor da superfície celular.
7. Fundir CFP a β -arrestina e YFP ao domínio citoplasmático do receptor β -adrenérgico, ou vice-versa. Em qualquer um dos casos, iluminar a 433 nm e observar a fluorescência tanto em 476 nm como em 527 nm. Se ocorrer interação, a intensidade de luz emitida diminui em 476 nm e aumenta em 527 nm devido à adição de adrenalina às células que expressam as proteínas de fusão. Se não ocorrer interação, o comprimento de onda da luz emitida permanecerá em 476 nm. Algumas razões de como isso pode não dar certo: as proteínas de fusão (1) são inativas ou incapazes de interagir, (2) não são translocadas para a localização subcelular normal ou (3) não resistem à degradação por proteólise.
8. A vasopressina age por elevar a $[\text{Ca}^{2+}]$ para 10^{-6} M, ativando a proteína-quinase C. A injeção de EGTA bloqueia a ação da vasopressina, mas não afeta a resposta ao glucagon, que usa cAMP e não Ca^{2+} como segundo mensageiro.
9. A amplificação deve-se ao fato de que uma molécula de catalisador ativa muitas moléculas do outro catalisador, em uma cascata e amplificação que envolve, em ordem, receptor de insulina, IRS-1, Raf, MEK, ERK. A ERK ativa um fator de transcrição, que estimula a produção de mRNA.
10. Uma mutação em *ras* que inative a atividade GTPásica de Ras pode criar uma proteína que, uma vez ativada pela ligação com GTP, continuará a manter, por meio de Raf, a resposta ao sinal de insulina.
11. *Propriedades comuns entre Ras e G_s* : as duas ligam GDP ou GTP; as duas são ativadas por GTP; as duas, quando ativas, ativam enzimas que vêm a seguir na cascata; as duas têm atividade GTPásica intrínseca que as desativa depois de permanecerem ativas por um período curto. *Diferenças*: Ras é uma proteína pequena e monomérica; G_s é heterodimérica. *Diferenças funcionais entre G_s e G_i* : G_s ativa a adenilil-ciclase, e G_i a inibe.
12. *Cinase (fator em parênteses)*: é uma pPKA (cAMP); PKG (cGMP); PKC (Ca^{2+} , DAG); Ca^{2+} /CaM-cinase (Ca^{2+} , CaM); cinase dependente de ciclina (ciclina); proteína tirosina-quinase (receptor-ligante, como a insulina); MAPK (Raf); Raf (Ras); glicogênio-fosforilase-cinase (PKA).
13. G_s permanece na forma ativa quando um análogo não hidrolisável está ligado. Assim, o análogo prolonga o efeito da adrenalina na célula onde foi injetado.

14. (a) Uso de esferas ligadas com α -bungarotoxina para purificação do AChR por afinidade (ver Figura 3-17c). Extrair as proteínas dos órgãos elétricos e passar a mistura através de uma coluna de cromatografia; o AChR liga-se seletivamente às esferas. Eluir o AChR com um solvente que enfraqueça as interações entre AChR e a α -bungarotoxina. (b) Usar a ligação com $[^{125}\text{I}]\alpha$ -bungarotoxina como um *ensaio quantitativo* de AChR durante as etapas de purificação pelas várias técnicas. Após cada etapa, determinar a AChR medindo a $[^{125}\text{I}]\alpha$ -bungarotoxina ligada a proteínas nas amostras. Otimizar a purificação para a maior atividade específica de AChR (contagens/min de $[^{125}\text{I}]\alpha$ -bungarotoxina ligada por mg de proteína) no material final.

15. A hiperpolarização faz os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem presentes na região pré-sináptica dos cones se fecharem. A consequente redução na $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{dentro}}$ diminui a liberação de um neurotransmissor inibitório que suprime a atividade do neurônio seguinte no circuito da visão. Quando essa inibição é removida em resposta a um estímulo de luz, o circuito fica ativo, e os centros visuais do cérebro são excitados.

16. Pessoas com doença de Oguchi podem ter um defeito na rodopsina-cinase ou na arrestina.

17. Os bastonetes podem não apresentar mais mudança no potencial de membrana em resposta à luz. Esse experimento foi realizado. A iluminação ativa PDE, mas a enzima pode não reduzir significativamente o nível de 8-Br-cGMP, que permanece bem acima do necessário para manter abertos os canais iônicos regulados por portão. Assim, a luz não causa qualquer impacto no potencial de membrana.

18. (a) Quando expostos ao calor, os canais TRPV1 abrem-se, causando um influxo de Na^+ e Ca^{2+} no neurônio sensorial. Isso despolariza o neurônio, disparando um potencial de ação. Quando o potencial de ação atinge o terminal do axônio, o neurotransmissor é liberado, sinalizando ao sistema nervoso que foi sentido calor. (b) A capsaicina mimetiza o efeito do calor em abrir TRPV1 (mesmo em baixa temperatura), o que leva a uma falsa sensação de calor. A EC_{50} extremamente baixa indica que mesmo pequenas quantidades de capsaicina têm um efeito sensorial dramático. (c) Em níveis baixos, o mentol abre o canal TRPM8, levando a uma sensação de frio; em níveis altos, tanto TRPM8 quanto TRPV3 se abrem, levando a uma sensação mista de frio e calor, como ocorre quando se prova pimentas muito fortes.

19. (a) Essas mutações podem levar a uma ativação permanente do receptor de PGE_2 , levando a uma divisão celular desregulada e à formação de um tumor. (b) O gene do vírus pode codificar uma forma constitutivamente ativa do receptor, provocando um sinal constante para a divisão celular e, consequentemente, para a formação do tumor. (c) A proteína E1A pode ligar-se a pRb e impedir que E2F se ligue, e, assim, E2F fica constantemente ativa e as células se dividem de maneira descontrolada. (d) As células do pulmão normalmente não respondem a PGE_2 porque elas não expressam o receptor de PGE_2 ; mutações que ativam constitutivamente o receptor de PGE_2 não afetarão as células de pulmão.

20. Um gene supressor de tumor codifica uma proteína que freia a divisão celular. A forma mutante da proteína não consegue suprimir a divisão celular, mas se o outro dos dois alelos da pessoa codificar para uma proteína normal, a função continuará normal. Um oncogene normal codifica uma proteína regulatória que dispara a divisão celular apenas quando um sinal apropriado (fator de crescimento) estiver presente. A versão mutante do produto do oncogene constantemente envia sinal para que a divisão ocorra, estando presentes fatores de crescimento ou não.

21. Em uma criança que desenvolve tumores múltiplos nos dois olhos, cada célula da retina tem uma cópia defeituosa do gene *Rb* já ao nascer. Logo na primeira infância, várias células sofrem, independentemente, uma segunda mutação que danifica o alelo *Rb* bom, produzindo um tumor. Uma criança que desenvolve um único tumor tem, ao nascer, duas cópias boas do gene *Rb* em todas as células; mutação nos dois alelos *R* em uma célula (extremamente raro) causa apenas um tumor.

22. Duas células que expressam o mesmo receptor de superfície podem ter complementos diferentes para atingir as proteínas que são fosforiladas.

23. (a) O modelo celular que prediz haver receptores diferentes em células diferentes. (b) Esse experimento aborda o assunto da independência entre as diferentes sensações gustatórias. Mesmo que os receptores para sabor doce e/ou sabor umami sejam perdidos, as outras sensações gustatórias dos animais são normais; assim, as sensações gustatórias pra-

zerosas e desagradáveis são independentes. **(c)** Sim. A perda tanto da subunidade T1R1 como da subunidade T1R3 abole a sensação do sabor umami. **(d)** Os dois modelos. Em qualquer dos dois modelos, a remoção de um receptor abolirá a sensação gustatória. **(e)** Sim. A perda da subunidade T1R2 ou da subunidade T1R3 abole quase que completamente a sensação de sabor doce; a eliminação completa do gosto doce necessita da deleção de ambas as subunidades. **(f)** Em concentrações muito altas de sacarose, o receptor T1R2 e, em menor grau, o receptor T1R3, na forma de homodímeros, podem detectar o sabor doce. **(g)** Os resultados são consistentes com os dois modelos para a sensação gustatória, mas não reforçam as conclusões dos pesquisadores. A ligação coligante pode ser completamente separada da sensação gustatória. Se o ligante de um receptor em “células de sabor doce” liga uma molécula, o camundongo preferirá essa molécula por ser um composto doce.

Capítulo 13

1. Considere o desenvolvimento do pinto como um sistema; os nutrientes, a casca do ovo e o mundo externo como arredores. A transformação de uma única célula em um pinto reduz drasticamente a entropia do sistema. Inicialmente, as partes do ovo fora do embrião (os arredores) contêm moléculas complexas de combustíveis (condição de entropia baixa). Durante a incubação, algumas dessas moléculas complexas são convertidas em um grande número de moléculas de CO_2 e H_2O (entropia alta). Esse aumento na entropia dos arredores é maior do que a diminuição da entropia no pinto (o sistema).

2. **(a)** $-4,8 \text{ kJ/mol}$ **(b)** $7,56 \text{ kJ/mol}$ **(c)** $-13,7 \text{ kJ/mol}$

3. **(a)** 262 **(b)** 608 **(c)** 0,30

4. $K'_{\text{eq}} = 21$; $\Delta G'^{\circ} = -7,6 \text{ kJ/mol}$

5. -31 kJ/mol

6. **(a)** $-1,68 \text{ kJ/mol}$. **(b)** $-4,4 \text{ kJ/mol}$. **(c)** Em dada temperatura, o valor da $\Delta G'^{\circ}$ para qualquer reação é fixo e definido para condições-padrão (neste caso, tanto frutose-6-fosfato como glicose-6-fosfato em 1 M). Por outro lado, ΔG é uma variável que pode ser calculada para um dado conjunto de concentrações de reagentes e produtos.

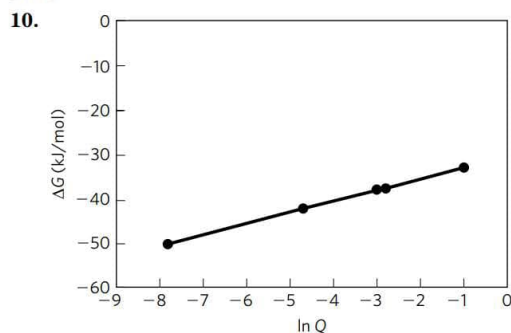
7. $K'_{\text{eq}} \approx 1$; $\Delta G'^{\circ} \approx 0$

8. Menos. A equação total da hidrólise de ATP pode ser aproximada da seguinte maneira



(Isso é apenas uma aproximação, uma vez que as espécies ionizadas mostradas são maioritárias, mas não são as únicas formas presentes.) Sob condições-padrão ($[\text{ATP}] = [\text{ADP}] = [\text{P}_i] = 1 \text{ M}$), a concentração da água é 55 M e não se altera durante a reação. Como são produzidos íons H^+ na reação, em alta $[\text{H}^+]$ (pH 5,0), o equilíbrio pode ser desviado para esquerda, e menos energia livre será liberada.

9. 10



ΔG para a hidrólise de ATP é menor quando $[\text{ATP}]/[\text{ADP}]$ for alta. A energia disponível para a célula a partir de uma determinada $[\text{ATP}]$ é menor quando a relação $[\text{ATP}]/[\text{ADP}]$ cai e maior quando a relação aumenta.

11. **(a)** $3,85 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}$; $[\text{glicose-6-fosfato}] = 8,9 \times 10^{-8} \text{ M}$. Não. A $[\text{glicose-6-fosfato}]$ é muito maior do que isso, favorecendo a reação inversa. **(b)** 14 M. Não. A solubilidade máxima da glicose é menor do que 1 M. **(c)** 837 ($\Delta G'^{\circ} = -16,7 \text{ kJ/mol}$); $[\text{glicose}] = 1,2 \times 10^{-7} \text{ M}$. Sim. Essa via de reação pode ocorrer com uma concentração de glicose que seja facilmente

solúvel e não produz uma grande força osmótica. **(d)** Não. Isso precisaria de uma $[\text{P}_i]$ tão alta que os sais com fosfato com cátions divalentes precipitaria. **(e)** Pela transferência direta de grupos fosforila do ATP para a glicose, o potencial de transferência (“tendência” ou “pressão”) de grupos fosforila do ATP é utilizado sem gerar concentrações altas de intermediários. A parte essencial dessa transferência, obviamente, é a catálise enzimática.

12. **(a)** $-12,5 \text{ kJ/mol}$ **(b)** $-14,6 \text{ kJ/mol}$

13. **(a)** 3×10^{-4} **(b)** 68,7 **(c)** $7,4 \times 10^4$

14. -13 kJ/mol

15. $46,7 \text{ kJ/mol}$

16. A isomerização move o grupo carbonila de C-1 para C-2, colocando a ligação carbono-carbono a ser clivada entre C-3 e C-4. Sem isomerização, a ligação clivada seria entre C-2 e C-3, gerando um composto de dois carbonos e um composto de quatro carbonos.

17. O mecanismo é o mesmo da reação da álcool-desidrogenase (ver Figura 14-14).

18. A primeira etapa é o inverso de uma condensação aldólica (ver mecanismo da aldolase, Figura 13-4) e a segunda etapa é uma condensação aldólica (ver Figura 13-4).

19. **(a)** Oxidação-redução, desidrogenase com NAD^+ como cofator; também são produzidos $\text{NADH} + \text{H}^+$. **(b)** Isomerização, isomerase. **(c)** Rearranjo interno, isomerase. **(d)** Transferência de grupo fosforila, cinase e ATP; há produção de ADP. **(e)** Hidrólise, protease ou peptidase e H_2O . **(f)** Oxidação-redução, NAD^+ como cofator da desidrogenase, também há produção de $\text{NADH} + \text{H}^+$. **(g)** Oxidação-redução, desidrogenase com NAD^+ como cofator e H_2O ; também há produção de $\text{NADH} + \text{H}^+$.

20. ATP; os produtos da hidrólise da fosfoarginina são estabilizados por formas de ressonância que não são possíveis na molécula intacta.

21. A resposta é sim. Caso $[\text{ADP}]$ e $[\text{polifosfatos}]$ sejam mantidas altas e $[\text{ATP}]$ seja mantida baixa, a variação de energia livre real será negativa.

22. **(a)** 46 kJ/mol. **(b)** 46 kg; 68%. **(c)** ATP é sintetizado conforme a necessidade e então quebrado à ADP e P_i ; a concentração é mantida em estado estacionário.

23. O sistema de síntese de ATP está em estado estacionário dinâmico; a $[\text{ATP}]$ permanece constante porque a velocidade do consumo de ATP é igual à velocidade da síntese. O consumo de ATP envolve a liberação do grupo fosforila terminal (γ); a síntese de ATP a partir de ADP envolve a reposição desse grupo. Por isso, a renovação da fosforila terminal é rápida. Em contrapartida, a fosforila central (β) tem um grau de renovação relativamente lento.

24. **(a)** 1,7 kJ/mol. **(b)** A pirofosfatase inorgânica catalisa a hidrólise do pirofosfato e impulsiona a reação líquida no sentido da síntese de acetil-CoA.

25. 36 kJ/mol

26. **(a)** NAD^+/NADH . **(b)** Piruvato/lactato. **(c)** Formação de lactato. **(d)** $-26,1 \text{ kJ/mol}$. **(e)** $3,63 \times 10^4$.

27. **(a)** 1,14 V **(b)** -220 kJ/mol **(c)** ~ 4

28. **(a)** $-0,35 \text{ V}$ **(b)** $-0,320 \text{ V}$ **(c)** $-0,29 \text{ V}$

29. Tendências em ordem crescente: **(a)**, **(d)**, **(b)**, **(c)**.

30. **(c)** e **(d)**.

31. **(a)** O estado de menor energia e maior entropia ocorre quando a concentração do corante é a mesma nas duas células. Caso esta junção gap “armadilha de peixe” permitisse um transporte unidirecional, mais corante acabaria ficando nos oligodendrócitos e menos nos astrócitos. Esse seria um estado de maior energia e menor entropia do que o estado inicial, violando a segunda lei da termodinâmica. O modelo proposto por Robinson e colaboradores necessita de um aumento espontâneo impossível na entropia. Em termos de energia, o modelo supõe uma mudança espontânea de um estado de menor energia para um estado de maior energia sem receber energia, novamente uma impossibilidade termodinâmica. **(b)** As moléculas, ao contrário dos peixes, não possuem comportamento dirigido; elas movimentam-se aleatoriamente em movimento Browniano. A difusão leva a um movimento líquido de moléculas de uma região de maior concentração para uma região de menor concentração simplesmente porque é muito mais provável que uma molécula que esteja no lado de maior concentração entre no canal de conexão. Considere essa via como

tendo uma etapa limitante: a extremidade estreita do canal. A extremidade estreita limita a velocidade com a qual as moléculas passam, uma vez que o movimento aleatório das moléculas torna menos provável que elas se movimente através do canal de menor diâmetro. A extremidade larga do canal *não* funciona como um funil para as moléculas, embora funcione para os peixes, porque as moléculas não ficam “espremidas” pelos lados do funil estreito, como os peixes podem ficar. A extremidade estreita limita igualmente o movimento nas duas direções. Quando as concentrações dos dois lados são iguais, as velocidades de movimento nas duas direções se igualam, e a concentração não se altera mais. (c) Os peixes apresentam um *comportamento não aleatório*, ajustando as suas ações em resposta ao ambiente. O peixe que entra na abertura larga do canal tende a se mover para a frente, visto que os peixes têm um comportamento que os faz terem essa tendência de se mover para a frente, e, assim, eles se sentem “espremidos” quando se movem para a frente no canal apertado. Para um peixe, é fácil entrar na abertura apertada, mas eles não saem da armadilha tão facilmente, uma vez que têm uma tendência menor a entrar em aberturas estreitas. (d) Existem muitas explicações possíveis, algumas das quais foram propostas pelas cartas dos leitores que criticaram o artigo e duas delas são apresentadas a seguir. (1) *O corante liga-se a uma molécula no oligodendrócito*. A ligação remove o corante do solvente e, assim, ele não “conta” como um soluto nas considerações termodinâmicas, embora permaneça visível ao microscópio de fluorescência. (2) *O corante pode ser sequestrado em uma organela subcelular dos oligodendrócitos*, tanto por ser bombeado ativamente à custa de ATP ou por ser atraído por outras moléculas presentes nessa organela.

Capítulo 14

1. Equação líquida: $\text{Glicose} + 2\text{ATP} \rightarrow 2 \text{ gliceraldeído-3-fosfato} + 2\text{ADP} + 2\text{H}^+$; $\Delta G^\circ = 2,1 \text{ kJ/mol}$.

2. Equação líquida: $2 \text{ gliceraldeído-3-fosfato} + 4\text{ADP} + 2\text{P}_i \rightarrow 2 \text{ lactato} + 2\text{NAD}^+$; $\Delta G^\circ = -114 \text{ kJ/mol}$.

3. GLUT2 (e GLUT1) é encontrado no fígado e está sempre presente na membrana plasmática de hepatócitos. GLUT3 está sempre presente na membrana plasmática de certas células do encéfalo. GLUT4 está normalmente sequestrado em vesículas nas células dos tecidos muscular e adiposo, e aparece na membrana plasmática apenas em resposta à insulina. Assim, fígado e encéfalo podem captar glicose do sangue de modo independente do nível de insulina, mas os tecidos muscular e adiposo captam glicose apenas quando os níveis de insulina estão elevados em resposta a níveis altos de glicose no sangue.

4. $\text{CH}_3\text{CHO} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{NAD}^+$ $K'_{\text{eq}} = 1,45 \times 10^4$

5. $-8,6 \text{ kJ/mol}$

6. (a) $^{14}\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$. (b) $[3-^{14}\text{C}]\text{glicose}$ ou $[4-^{14}\text{C}]\text{glicose}$.

7. A fermentação libera energia, parte da qual é conservada na forma de ATP, mas boa parte dela é dissipada como calor. A menos que os tanques de fermentação sejam resfriados, a temperatura aumentaria tanto que mataria os microrganismos.

8. Os grãos de soja e trigo contêm amido, um polímero de resíduos de glicose. Os microrganismos degradam o amido a glicose, a qual é convertida em piruvato via glicólise e — como o processo é realizado na ausência de O_2 (i.e., é uma fermentação) — o piruvato é convertido em ácido láctico e etanol. Se O_2 estivesse presente, o piruvato seria oxidado a acetil-CoA e, então, a CO_2 e H_2O . Parte da acetil-CoA, contudo, seria hidrolisada a ácido acético (vinagre) na presença de oxigênio.

9. C-1. Esse experimento demonstra a reversibilidade da reação da aldolase. O C-1 do gliceraldeído-3-fosfato é equivalente ao C-4 da frutose-1,6-bisfosfato (ver Figura 14-7). O gliceraldeído-3-fosfato inicial deve ter sido marcado em C-1. O C-3 da di-hidroxiacetona-fosfato torna-se marcado por meio da reação da triose-fosfato-isomerase, originando, assim, frutose-1,6-bisfosfato marcado em C-3.

10. Não. Não haveria produção anaeróbica de ATP; a produção aeróbica de ATP seria apenas ligeiramente diminuída.

11. Não. A lactato-desidrogenase é necessária para reciclar NAD^+ a partir do NADH formado durante a oxidação do gliceraldeído-3-fosfato.

12. A transformação de glicose em lactato ocorre quando pouco oxigênio chega aos miócitos e fornece um meio de gerar ATP em condições com pouco O_2 . Uma vez que o lactato pode ser oxidado a piruvato, a

glicose não é desperdiçada; o piruvato é oxidado por reações aeróbicas quando houver pleno suprimento de O_2 . Essa flexibilidade metabólica dá ao organismo uma maior capacidade de adaptação ao ambiente.

13. A célula remove rapidamente o 1,3-bisfosfoglicerato em uma etapa subsequente favorável, catalisada pela fosfoglicerato-cinase.

14. (a) 3-Fosfoglicerato é o produto. (b) Na presença de arsenato não há síntese líquida de ATP sob condições anaeróbicas.

15. (a) A fermentação de etanol requer 2 moles de P_i por mol de glicose. (b) O etanol é o produto reduzido formado durante a reoxidação do NADH a NAD^+ , e o CO_2 é o produto colateral da conversão de piruvato a etanol. A resposta é sim. O piruvato deve ser convertido em etanol, a fim de produzir um suprimento contínuo de NAD^+ para a oxidação do gliceraldeído-3-fosfato. A frutose-1,6-bisfosfato acumula-se; ela é formada como um intermediário da glicólise. (c) O arsenato substitui o P_i na reação da gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, levando à produção de um acil-arsenato, que sofre hidrólise espontânea. Isso impede a formação de ATP, porém o 3-fosfoglicerato continua na via.

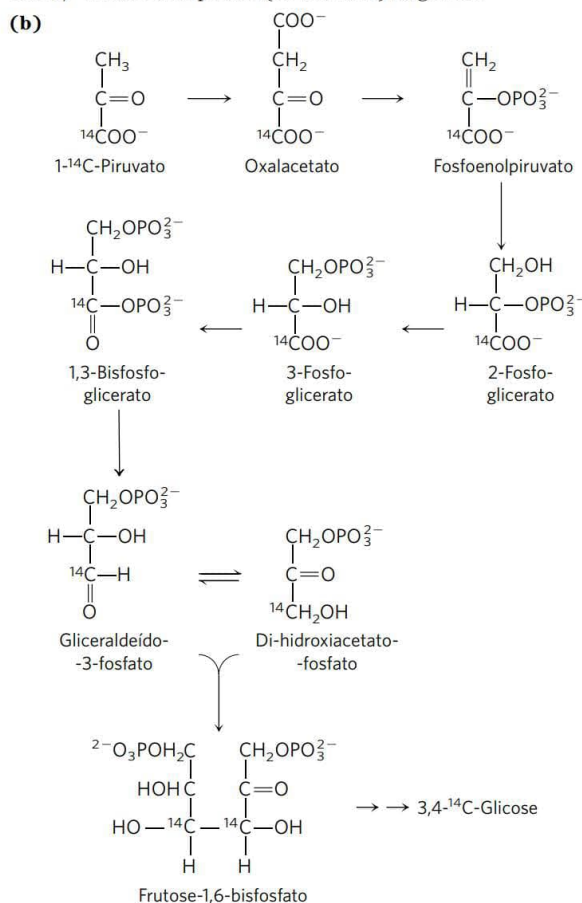
16. A niacina da dieta é usada para sintetizar NAD^+ . Oxidações envolvendo o NAD^+ são parte de um processo cíclico, com o NAD^+ como carreador de elétrons (agente redutor); uma molécula de NAD^+ pode oxidar muitos milhares de moléculas de glicose, de modo que as necessidades dietéticas para a vitamina precursora (niacina) são relativamente pequenas.

17. Di-hidroxiacetona fosfato + $\text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{glicerol-3-fosfato} + \text{NAD}^+$ (catalisada por uma desidrogenase).

18. Deficiência de galactocinase: galactose (menos tóxica); deficiência de UDP-glicose:galactose-1-fosfato uridililtransferase: galactose-1-fosfato (mais tóxica).

19. As proteínas são degradadas em aminoácidos, usados para a gliconeogênese.

20. (a) Na reação da piruvato-carboxilase, $^{14}\text{CO}_2$ é adicionado ao piruvato, mas a PEP-carboxicinas remove o *mesmo* CO_2 na próxima etapa. Assim, ^{14}C não é incorporado (inicialmente) na glicose.



21. 4 equivalentes de ATP por molécula de glicose.

22. A gliconeogênese seria altamente endergônica e seria impossível regular separadamente a gliconeogênese e a glicólise.

23. A célula “gasta” 1 ATP e 1 GTP na conversão de piruvato em PEP.

24. (a), (b), (d) são glicogênicos; (c) (e) não são.

25. O consumo de álcool força a competição pelo NAD^+ entre o metabolismo do etanol e a gliconeogênese. O problema aumenta com exercício intenso e com a falta de alimento, pois nessas situações o nível de glicose sanguínea já está baixo.

26. (a) O rápido aumento na glicólise; o aumento no piruvato e no NADH resulta em um aumento no lactato. (b) O lactato é transformado em glicose via piruvato; esse é um processo mais lento, pois a formação do piruvato é limitada pela disponibilidade de NAD^+ , o equilíbrio da reação da lactato-desidrogenase favorece o lactato e a conversão de piruvato em glicose necessita de energia. (c) O equilíbrio da reação da lactato-desidrogenase favorece a formação de lactato.

27. O lactato é transformado em glicose no fígado via gliconeogênese (ver Figuras 14-16, 14-17). Um defeito na FBPase-1 impediria a entrada de lactato na gliconeogênese nos hepatócitos, causando acúmulo de lactato no sangue.

28. O succinato é transformado em oxalacetato, que passa para o citosol e é convertido em PEP pela PEP-carboxicinas. Dois moles de PEP são, então, necessários para produzir um mol de glicose pela via descrita na Figura 14-17.

29. Se as vias catabólica e anabólica do metabolismo da glicose estivessem operando simultaneamente, ocorreriam reciclagens não produtivas de ADP e ATP, com consumo extra de O_2 .

30. O acúmulo de ribose-5-fosfato no mínimo tenderia a forçar essa reação no sentido inverso pela lei de ação das massas (ver Equação 13-4). Outras reações metabólicas que envolvem ribose-5-fosfato como substrato ou produto também poderiam ser afetadas — como, por exemplo, as vias de síntese de nucleotídeos.

31. (a) A tolerância ao etanol provavelmente envolva muitos genes mais, e assim a engenharia de construção dessa bactéria tornaria-se um projeto muito mais amplo. (b) A L-arabinose isomerase (a enzima *araA*) converte uma aldose em uma cetose, movendo a carbonila em um açúcar não fosforilado de C-1 para C-2. Não foram discutidas enzimas análogas neste capítulo; todas as enzimas aqui descritas atuam sobre açúcares fosforilados. Uma enzima que catalisa uma transformação similar com açúcares fosforilados é a fosfo-hexose-isomerase. A L-ribulocinase (*araB*) fosforila um açúcar em C-5 pela transferência do fosfato γ do ATP. Muitas dessas reações são descritas neste capítulo, incluindo a reação da hexocinase. A L-ribulose 5-fosfato-epimerase (*araD*) troca as posições dos grupos $-\text{H}$ e $-\text{OH}$ no carbono quiral de um açúcar. Não foi descrita uma reação análoga neste capítulo, mas ela é descrita no Capítulo 20 (ver Figura 20-40). (c) As três enzimas *ara* converteriam arabinose em xilulose-5-fosfato por meio da seguinte via: Arabinose $\xrightarrow{\text{L-arabinose-isomerase}}$ L-ribulose $\xrightarrow{\text{L-ribulocinase}}$ L-ribulose-5-fosfato $\xrightarrow{\text{epimerase}}$ xilulose-5-fosfato. (d) A arabinose é convertida em xilulose-5-fosfato como em (c), e esta última entra na via descrita na Figura 14-23; a glicose-6-fosfato produzida é, então, fermentada a etanol e CO_2 . (e) Seis moléculas de arabinose + 6 moléculas de ATP são convertidas em 6 moléculas de xilulose-5-fosfato, que alimentam a via mostrada na Figura 14-23, produzindo 5 moléculas de glicose-6-fosfato, que são fermentadas para produzir, cada uma delas, 3 ATP (elas entram na via como glicose-6-fosfato, não como glicose) — 15 ATP ao todo. No conjunto, você esperaria um rendimento de 15 ATP — 6 ATP = 9 ATP a partir de 6 moléculas de arabinose. Os demais produtos são 10 moléculas de etanol e 10 moléculas de CO_2 . (f) Dado o baixo rendimento em ATP, para um determinado crescimento (i.e., de ATP disponível) equivalente, para crescer sem os genes adicionados, o *Z. mobilis* produzido por engenharia genética deve fermentar mais arabinose, produzindo, assim, mais etanol. (g) Um modo de permitir o uso de xilulose seria adicionar os genes para duas enzimas: um análogo da enzima *araD*, que converte xilulose em ribose mudando as posições de $-\text{H}$ e $-\text{OH}$ em C-3, e um análogo da enzima *araB*, que fosforila a ribose em C-5. A ribose-5-fosfato resultante entraria na via existente.

Capítulo 15

1. (a) 0,0293. (b) 308. (c) Não. Q é muito menor que a K'_{eq} , indicando que a reação da PFK-1 nas células está distante do equilíbrio; essa reação é mais lenta que as reações subsequentes na glicólise. O fluxo através da via glicolítica é determinado principalmente pela atividade da PFK-1.

2. (a) $1,4 \times 10^{-9}$ M. (b) A concentração fisiológica (0,023 mM) é 16 mil vezes a concentração no equilíbrio; esta reação não alcança o equilíbrio na célula. Muitas reações na célula não estão em equilíbrio.

3. Na ausência de O_2 , as necessidades de ATP são atendidas pelo metabolismo anaeróbico da glicose (fermentação a lactato). Uma vez que a oxidação aeróbica da glicose produz muito mais ATP que a fermentação, uma menor quantidade de glicose será necessária para produzir a mesma quantidade de ATP.

4. (a) Há dois sítios de ligação para o ATP: um sítio catalítico e um sítio regulador. A ligação do ATP a um sítio regulador inibe a PFK-1, reduzindo $V_{\text{máx}}$ ou aumentando a K_m para o ATP no sítio catalítico. (b) O fluxo pela via glicolítica é reduzido quando houver boa quantidade de ATP. (c) O gráfico indica que um aumento na [ADP] suprime a inibição pelo ATP. Uma vez que o conjunto de nucleotídeos de adenina é relativamente constante, o consumo de ATP leva a um aumento na [ADP]. Os dados mostram que a atividade da PFK-1 pode ser regulada pela razão [ATP]/[ADP].

5. O grupo fosfato da glicose-6-fosfato está completamente ionizado em pH 7, o que confere à molécula uma carga negativa. Como as membranas geralmente são impermeáveis a moléculas com carga elétrica, a glicose-6-fosfato não pode passar da corrente sanguínea para as células e, assim, não pode entrar na via glicolítica e gerar ATP. (Essa é a razão pela qual a glicose, uma vez fosforilada, não pode escapar da célula.)

6. (a) *No músculo*: a degradação do glicogênio fornece energia (ATP) via glicólise. A glicogênio fosforilase catalisa a conversão do glicogênio armazenado em glicose-1-fosfato, que é convertida em glicose-6-fosfato, um intermediário da glicólise. Durante exercício físico intenso, o músculo esquelético requer grandes quantidades de glicose-6-fosfato. *No fígado*: a degradação do glicogênio mantém um nível constante de glicose no sangue entre as refeições (a glicose-6-fosfato é convertida em glicose livre). (b) No músculo realizando trabalho, as necessidades de fluxo de ATP são muito altas, e a glicose-1-fosfato deve ser produzida rapidamente, requerendo uma alta $V_{\text{máx}}$.

7. (a) 3,3/1. (b), (c) O valor dessa razão na célula (>1 00:1) indica que a [glicose-1-fosfato] está bem abaixo do valor de equilíbrio. A taxa com que a glicose-1-fosfato é removida (por sua entrada na glicólise) é maior que sua taxa de produção (pela reação da glicogênio-fosforilase), de modo que o fluxo metabólico vai do glicogênio para a glicose-1-fosfato. A reação da glicogênio-fosforilase é provavelmente o passo regulado na degradação do glicogênio.

8. (a) Aumenta. (b) Diminui. (c) Aumenta.

9. *Em repouso*: [ATP] alta; [AMP] baixa; [acetil-CoA] e [citrato] intermediárias. *Na corrida*: [ATP] intermediária; [AMP] alta; [acetil-CoA] e [citrato] baixas. O fluxo de glicose pela glicólise aumenta durante uma corrida anaeróbica, pois (1) a inibição da glicogênio-fosforilase e da PFK-1 pelo ATP é parcialmente revertida, (2) o AMP estimula ambas as enzimas, e (3) níveis mais baixos de citrato e de acetil-CoA implicam em diminuição em seus efeitos inibitórios sobre a PFK-1 e a piruvato-cinase, respectivamente.

10. Um pássaro migratório depende de uma oxidação aeróbica altamente eficiente das gorduras, e não do metabolismo anaeróbico da glicose, usado por um coelho em fuga, este último um exercício intenso e de curta duração. O pássaro reserva seu glicogênio muscular para curtos disparos de gasto de energia durante emergências.

11. *Caso A*: (f), (3); *caso B*: (c), (3); *caso C*: (h), (4); *caso D*: (d), (6).

12. (a) (1) Tecido adiposo: menor velocidade da síntese de ácidos graxos. (2) Músculo: redução na glicólise, na síntese de ácidos graxos e na síntese de glicogênio (3) Fígado: a glicólise está mais rápida; a gliconeogênese, a síntese de glicogênio e a síntese de ácidos graxos estão com suas velocidades reduzidas; a via das pentoses-fosfato não está alterada. (b) (1) Tecido adiposo e (3) fígado: a síntese de ácidos graxos diminui, pois a falta de insulina resulta em inativação da acetil-CoA-carboxilase, a primeira enzima da síntese dos ácidos graxos. A síntese de glicogênio é inibida por fosforilação dependente de cAMP da glicogênio-sintase.

(2) Músculo: a glicólise diminui, pois o GLUT4 está inativo, e a captação de glicose está inibida. (3) Fígado: a glicólise diminui, pois a enzima bifuncional PFK-2/FBPase-2 é convertida na forma em que a FBPase-2 está ativa, diminuindo a [frutose-2,6-bisfosfato], que estimula alostericamente a fosfofrutocinase e inibe a FBPase-1; esse mecanismo também explica a estimulação da gliconeogênese.

13. (a) Aumentado. (b) Aumentado. (c) Aumentado.

14. (a) A PKA não pode ser ativada em resposta ao glucagon ou à adrenalina, e a glicogênio-fosforilase não é ativada. (b) A PP1 continua ativa, possibilitando a desfosforilação da glicogênio-sintase (ativando-a) e da glicogênio-fosforilase (inibindo-a). (c) A fosforilase continua fosforilada (ativa), aumentando a degradação do glicogênio. (d) A gliconeogênese não poderá ser estimulada quando a glicose sanguínea estiver baixa, levando a níveis de glicose no sangue perigosamente baixos durante períodos de jejum.

15. A queda na glicose sanguínea dispara a liberação de glucagon pelo pâncreas. No fígado, o glucagon ativa a glicogênio-fosforilase, estimulando sua fosforilação dependente de cAMP a gliconeogênese por diminuir a [frutose-2,6-bisfosfato], assim estimulando a FBPase-1.

16. (a) Capacidade reduzida para mobilizar o glicogênio; diminuição da glicemia entre as refeições. (b) Capacidade reduzida de diminuir a glicose sanguínea após uma refeição rica em carboidratos; aumento da glicemia. (c) Diminuição da frutose-2,6-bisfosfato (F26BP) no fígado, estimulando a glicólise e inibindo a gliconeogênese. (d) Redução da F26BP, estimulando a gliconeogênese e inibindo a glicólise. (e) Aumento da captação de ácidos graxos e glicose; aumento da oxidação de ambos. (f) Aumento da conversão de piruvato em acetil-CoA; aumento da síntese de ácidos graxos.

17. (a) Dado que cada partícula contém cerca de 55 mil resíduos de glicose, a concentração equivalente de glicose livre seria $55.000 \times 0,01 \mu\text{M} = 550 \text{ mM}$, ou $0,55 \text{ M}$. Isso apresentaria um sério desafio osmótico para a célula. (Os fluidos corporais têm uma osmolaridade substancialmente mais baixa.) (b) Quanto menor o número de ramificações, menor o número de extremidades livres disponíveis para a atividade da glicogênio-fosforilase, e menor a velocidade de liberação de glicose. Sem ramificações, haveria apenas um sítio para a fosforilase agir. (c) A camada externa da partícula estaria muito lotada de resíduos de glicose para a enzima ter acesso para clivar as ligações e liberar glicose. (d) O número de cadeias duplas em cada camada sucessiva: a camada 1 tem uma cadeia (2^0), a camada 2 tem duas (2^1), a camada 3 tem quatro (2^2), e assim por diante. Assim, para t camadas, o número de cadeias na camada mais externa, C_A , é 2^{t-1} . (e) O número total de cadeias é $2^0 + 2^1 + 2^2 + \dots + 2^{t-1} = 2^t - 1$. Cada cadeia contém g_c moléculas de glicose, de modo que o número total de moléculas de glicose, G_T , é $g_c(2^t - 1)$. (f) A glicogênio-fosforilase pode liberar todos os resíduos de glicose, com exceção de quatro, em uma cadeia de comprimento g_c . Portanto, a partir de cada cadeia na camada externa, podem ser liberadas $(g_c - 4)$ moléculas de glicose. Dado que há 2^{t-1} cadeias na camada externa, o número de moléculas de glicose que a enzima pode liberar, G_{PT} , é $(g_c - 4)(2^{t-1})$. (g) O volume de uma esfera é $\frac{4}{3}\pi r^3$. Neste caso, r é a espessura de uma camada vezes o número de camadas, ou $(0,12g_c + 0,35)t \text{ nm}$. Assim, $V_s = \frac{4}{3}\pi t^3(0,12g_c + 0,35)^3 \text{ nm}^3$. (h) Você pode mostrar algebricamente que o valor de g_c que maximiza f é independente de t . Escolhendo $t = 7$:

g_c	C_A	G_T	G_{PT}	V_s	f
5	64	635	64	1.232	2.111
6	64	762	128	1.760	3.547
7	64	889	192	2.421	4.512
8	64	1.016	256	3.230	5.154
9	64	1.143	320	4.201	5.572
10	64	1.270	384	5.350	5.834
11	64	1.397	448	6.692	5.986
12	64	1.524	512	8.240	6.060
13	64	1.651	576	10.011	6.079
14	64	1.778	640	12.019	6.059
15	64	1.905	704	14.279	6.011
16	64	2.032	768	16.806	5.943

O valor ótimo de g_c (i.e., no f máximo) é 13. Na natureza, g_c varia de 12 a 14, o que corresponde a valores de f muito próximos ao ótimo. Se você escolher um outro valor para t , os números serão diferentes, mas o g_c ótimo ainda será 13.

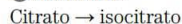
Capítulo 16

1. (a)

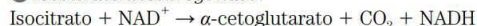
1 Citrato-sintase:



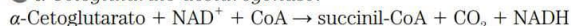
2 Aconitase:



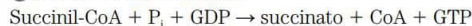
3 Isocitrato desidrogenase:



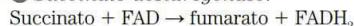
4 α -Cetoglutarato-desidrogenase:



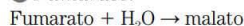
5 Succinil-CoA-sintetase:



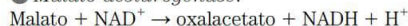
6 Succinato-desidrogenase:



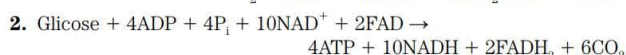
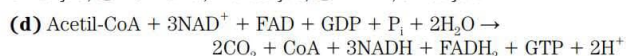
7 Fumarase:



8 Malato-desidrogenase:



(b), (c) 1 CoA, condensação; 2 nenhuma, isomerização; 3 NAD^+ , descarboxilação oxidativa; 4 NAD^+ , CoA e tiamina pirofosfato, descarboxilação oxidativa; 5 CoA, fosforilação no nível do substrato; 6 FAD, oxidação; 7 nenhuma, hidratação; 8 NAD^+ , oxidação.



3. (a) Oxidação; metanol \rightarrow formaldeído + $[\text{H}-\text{H}]$

(b) Oxidação; formaldeído \rightarrow formato + $[\text{H}-\text{H}]$

(c) Redução; CO_2 + $[\text{H}-\text{H}] \rightarrow$ formato + H^+

(d) Redução; glicerato + H^+ + $[\text{H}-\text{H}] \rightarrow$ gliceraldeído + H_2O

(e) Oxidação; glicerol \rightarrow di-hidroxiacetona + $[\text{H}-\text{H}]$

(f) Oxidação; $2\text{H}_2\text{O}$ + tolueno \rightarrow benzoato + H^+ + $3[\text{H}-\text{H}]$

(g) Oxidação; succinato \rightarrow fumarato + $[\text{H}-\text{H}]$

(h) Oxidação; piruvato + $\text{H}_2\text{O} \rightarrow$ acetato + CO_2 + $[\text{H}-\text{H}]$

4. Das fórmulas estruturais, observamos que a razão H/C das ligações aos carbonos é maior para o ácido hexanoico (11/6) do que para a glicose (7/6). O ácido hexanoico é mais reduzido e produz mais energia com a combustão completa a CO_2 e H_2O .

5. (a) Oxidado; etanol + $\text{NAD}^+ \rightarrow$ acetaldeído + $\text{NADH} + \text{H}^+$

(b) Reduzido; 1,3-bisfosfoglicerato + $\text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow$ gliceraldeído-3-fosfato + $\text{NAD}^+ + \text{HPO}_4^{2-}$

(c) Não mudou; piruvato + $\text{H}^+ \rightarrow$ acetaldeído + CO_2

(d) Oxidado; piruvato + $\text{NAD}^+ \rightarrow$ acetato + CO_2 + $\text{NADH} + \text{H}^+$

(e) Reduzido; oxalacetato + $\text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow$ malato + NAD^+

(f) Não mudou; acetoacetato + $\text{H}^+ \rightarrow$ acetona + CO_2

6. TPP: o anel tiazólico adiciona-se ao carbono α do piruvato e, então, estabiliza o carbânion resultante, atuando como grupo eletrofílico. Ácido lipoico: oxida o piruvato para o nível de acetato (acetil-CoA) e ativa o acetato, transformando-o em tioéster. CoA-SH: ativa o acetato, transformando-o em tioéster. FAD: oxida o ácido lipoico. NAD^+ : oxida o FAD.

7. A ausência de TPP, causada pela deficiência de tiamina, inibe a piruvato-desidrogenase; o piruvato acumula-se.

8. Descarboxilação oxidativa; NAD^+ ou NADP^+ ; reação da α -cetoglutarato-desidrogenase.

9. O consumo de oxigênio é uma medida da atividade dos dois primeiros estágios da respiração celular: glicólise e ciclo do ácido cítrico. A adição de oxalacetato ou de malato estimula o ciclo do ácido cítrico e, desse modo, estimula a respiração. O oxalacetato, ou o malato, adicionado tem um papel catalítico: ele é regenerado no final do ciclo do ácido cítrico.

10. (a) $5,6 \times 10^{-6}$ (b) $1,1 \times 10^{-8} \text{ M}$ (c) 28 moléculas

11. ADP (ou GDP), P_i , CoA-SH, TPP, NAD^+ ; o ácido lipoico *não*, pois está ligado covalentemente às enzimas isoladas que o utilizam.

12. Os nucleotídeos da flavina, FMN e FAD, não seriam sintetizados. Uma vez que o FAD é necessário para o ciclo do ácido cítrico, a deficiência em flavina inibiria fortemente o ciclo.

13. O oxalacetato poderia ser removido para a síntese de aspartato ou para a gliconeogênese. O oxalacetato é repostado por reações anapleróticas catalisadas pela PEP-carboxicinas, pela PEP-carboxilase, pela enzima málica ou pela piruvato-carboxilase (ver Figura 16-16).

14. O grupo fosfato terminal do GTP pode ser transferido para o ADP em uma reação catalisada pela nucleosídeo-difosfato-quinase, com uma constante de equilíbrio de 1,0: $GTP + ADP \rightarrow GDP + ATP$.

15. (a) $^-OOC-CH_2-CH_2-COO^-$ (succinato). **(b)** O malonato é o inibidor competitivo da succinato-desidrogenase. **(c)** Um bloqueio no ciclo do ácido cítrico faz cessar a formação de NADH, o que cessa a transferência de elétrons, que, por sua vez, faz cessar a respiração. **(d)** Um grande excesso de succinato (substrato) sobrepassa a inibição competitiva.

16. (a) Adicionando $[^{14}C]$ glicose marcada uniformemente e verificando a liberação de $^{14}CO_2$. **(b)** Igualmente distribuído em C-2 e C-3 do oxalacetato; um número infinito de rodadas.

17. O oxalacetato fica em equilíbrio com o succinato, no qual C-1 e C-4 são equivalentes. O oxalacetato derivado do succinato é marcado em C-1 e C-4, e o PEP produzido deste fica marcado em C-1, originando as marcações em C-3 e C-4 da glicose.

18. (a) C-1. **(b)** C-3. **(c)** C-3. **(d)** C-2 (grupo metila). **(e)** C-4. **(f)** C-4. **(g)** Igualmente distribuído em C-2 e C-3.

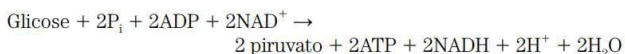
19. A tiamina é necessária para a síntese de TPP, um grupo prostético nos complexos da piruvato-desidrogenase e da α -cetoglutarato-desidrogenase. Uma deficiência em tiamina reduz a atividade desses complexos enzimáticos e causa o acúmulo de precursores observado.

20. Não. Para cada dois carbonos que entram como acetato, dois deixam o ciclo como CO_2 ; assim, não há síntese líquida de oxalacetato. A síntese líquida de oxalacetato ocorre por carboxilação do piruvato, uma reação anaplerótica.

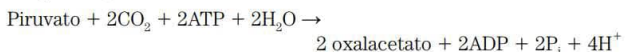
21. A resposta é sim. O ciclo do ácido cítrico seria inibido. O oxalacetato está presente em concentrações relativamente baixas na mitocôndria, e sua remoção para a gliconeogênese tenderia a deslocar o equilíbrio da reação da citrato-sintase para a produção de oxalacetato.

22. (a) Inibição da aconitase. **(b)** Fluorcitrato; compete com o citrato; por um amplo excesso de citrato. **(c)** Citrato e fluorcitrato são inibidores da PFK-1. **(d)** Todos os processos catabólicos necessários para a produção de ATP são inativados.

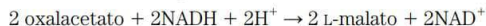
23. Glicólise:



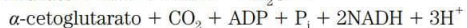
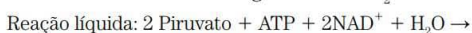
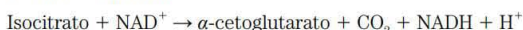
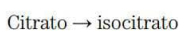
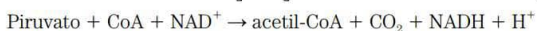
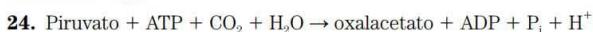
Reação da piruvato-carboxilase:



Reação da malato-desidrogenase:



Essa sequência recicla coenzimas da nicotinamida sob condições anaeróbicas. A reação global é: $\text{glicose} + 2CO_2 \rightarrow 2 \text{ L-malato} + 4H^+$. Quatro H^+ são produzidos por glicose, diminuindo o pH e, assim, aumentando a acidez do vinho.

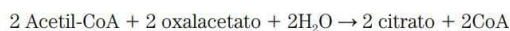
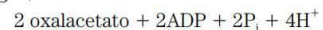
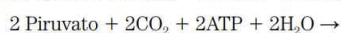
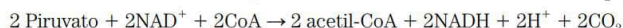
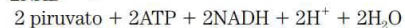
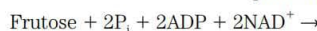
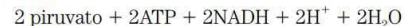


25. O ciclo participa de processos catabólicos e anabólicos. Por exemplo, ele gera ATP pela oxidação de substratos, mas também fornece precursores para a síntese de aminoácidos (ver Figura 16-16).

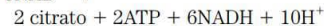
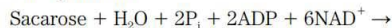
26. (a) Diminui. **(b)** Aumenta. **(c)** Diminui.

27. (a) O citrato é produzido pela ação da citrato-sintase sobre o oxalacetato e o acetil-CoA. A citrato-sintase pode ser utilizada para a síntese líquida de citrato quando (1) houver influxo contínuo de novas moléculas de oxalacetato e de acetil-CoA e (2) a síntese de isocitrato estiver restringida, como em um meio com baixa quantidade de Fe^{3+} . A aconitase requer Fe^{3+} , de modo que um meio restrito em Fe^{3+} restringe a síntese de aconitase.

(b) $\text{Sacarose} + H_2O \rightarrow \text{glicose} + \text{frutose}$



A reação total é



(c) A reação global consome NAD^+ . Uma vez que o conjunto dessa coenzima oxidada na célula é limitado, ela deve ser regenerada a partir do NADH pela cadeia de transporte de elétrons, com consumo de O_2 . Consequentemente, a conversão global de glicose em ácido cítrico é um processo aeróbico e requer oxigênio molecular.

28. A succinil-CoA é um intermediário do ciclo do ácido cítrico; seu acúmulo sinaliza fluxo reduzido no ciclo, demandando uma redução na entrada de acetil-CoA no ciclo. A citrato-sintase, por regular a principal via oxidativa da célula, regula o suprimento de NADH e, assim, o fluxo de elétrons do NADH para o O_2 .

29. O catabolismo de ácidos graxos aumenta a [acetil-CoA], o que estimula a piruvato-carboxilase. O aumento resultante na [oxalacetato] estimula o consumo de acetil-CoA pelo ciclo do ácido cítrico, e a [citrato] aumenta, inibindo a glicólise no nível da PFK-1. Além disso, o aumento na [acetil-CoA] inibe o complexo da piruvato-desidrogenase, diminuindo a utilização do piruvato originário da glicólise.

30. O oxigênio é necessário para reciclar o NAD^+ a partir do NADH produzido pelas reações oxidativas do ciclo do ácido cítrico. A reoxidação do NADH ocorre durante a fosforilação oxidativa mitocondrial.

31. Um aumento na razão $[NADH]/[NAD^+]$ inibe o ciclo do ácido cítrico pela ação das massas nas três etapas em que ocorre redução do NAD^+ ; alta [NADH] desloca o equilíbrio no sentido do NAD^+ .

32. No sentido do citrato; o ΔG para a reação da citrato-sintase nessas condições é de cerca de -8 kJ/mol .

33. As etapas 4 e 5 são essenciais para a reoxidação do cofator reduzido, lipoil, ligado à enzima por uma ligação amida.

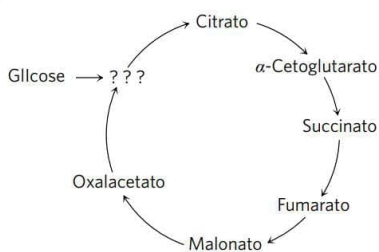
34. O ciclo do ácido cítrico é tão central para o metabolismo que um defeito grave em qualquer enzima do ciclo seria provavelmente letal para o embrião.

35. (a) A única reação no tecido muscular que consome quantidades significativas de oxigênio é a respiração celular, de modo que o consumo de O_2 é uma boa medida para a respiração. **(b)** O tecido muscular fresco contém certa quantidade de glicose residual; o consumo de O_2 deve-se à oxidação dessa glicose. **(c)** Sim. Uma vez que a quantidade de O_2 consumido aumentou quando citrato ou 1-fosfoglicerol foram adicionados, ambos podem servir como substrato para a respiração celular neste sistema. **(d) Experimento I:** o citrato está causando um consumo de O_2 muito maior que o esperado para sua oxidação completa. Cada molécula de citrato parece estar atuando como se fosse mais de uma molécula. A única explicação possível é que cada molécula de citrato funciona mais de uma vez na reação – o que é como funciona um catalisador. **Experimento II.** A chave é calcular o excesso de O_2 consumido em cada amostra, em comparação com o controle (amostra 1).

Amostra	Substrato(s) adicionada	$\mu\text{L O}_2$ absorvido	Excesso $\mu\text{L de O}_2$ consumido
1	Sem substrato extra	342	0
2	0,3 mL 0,2 M 1-fosfoglicerol	757	415
3	0,15 mL de citrato 0,02 M	431	89
4	0,3 mL 0,2 M 1-fosfoglicerol + 0,15 mL de citrato 0,02 M	1.385	1.043

Se citrato e 1-fosfoglicerol fossem simplesmente substratos para a reação, esperaria-se que o excesso de consumo de O_2 pela amostra 4 fosse a soma dos consumos em excesso individuais pelas amostras 2 e 3 ($415 \mu\text{L} + 89 \mu\text{L} = 504 \mu\text{L}$). Contudo, o excesso no consumo quando ambos os substratos estão presentes é aproximadamente duas vezes essa quantidade ($1.043 \mu\text{L}$). Assim, o citrato aumenta a capacidade do tecido de metabolizar 1-fosfoglicerol. Esse comportamento é típico de um catalisador. Ambos os experimentos (I e II) são necessários para tornar convincentes essas conclusões. Com base no experimento I apenas, observamos que o citrato está de algum modo acelerando a reação, mas não está claro se ele atua ajudando a metabolizar o substrato ou por algum outro mecanismo. Com base no experimento II apenas, não fica claro qual molécula é o catalisador, citrato ou 1-fosfoglicerol. Juntos, os experimentos mostram que o citrato está atuando como um “catalisador” para a oxidação do 1-fosfoglicerol. (e) Uma vez que a via pode consumir citrato (ver amostra 3), se o citrato atuar como um catalisador, ele deve ser regenerado. Se o conjunto de reações primeiramente consome e depois regenera o citrato, deve ser uma via circular, e não linear. (f) Quando a via estiver bloqueada na altura da reação da α -cetoglutarato-desidrogenase, o citrato é convertido em α -cetoglutarato, mas a via não segue adiante. O oxigênio é consumido pela reoxidação do NADH produzido pela isocitrato-desidrogenase.

(g)



Difere da Figura 16-7 pelo fato de não incluir *cis*-aconitato e isocitrato (entre o citrato e o α -cetoglutarato), ou succinil-CoA, ou acetil-CoA. (h) O estabelecimento de uma conversão quantitativa foi essencial para excluir uma via ramificada ou outra mais complexa.

Capítulo 17

1. A porção ácido graxo; os carbonos dos ácidos graxos são mais reduzidos que aqueles do glicerol.
2. (a) $4,0 \times 10^5 \text{ kJ}$ ($9,6 \times 10^4 \text{ kcal}$) (b) 48 dias (c) 0,218 kg/dia
3. A primeira reação na oxidação dos ácidos graxos é análoga à conversão de succinato em fumarato; a segunda reação, à conversão de fumarato em malato; a terceira reação, à conversão de malato em oxalacetato.
4. 8 ciclos; o último libera 2 acetil-CoA.
5. (a) $\text{R-COO}^- + \text{ATP} \rightarrow \text{acil-AMP} + \text{PP}_i$
 $\text{Acil-AMP} + \text{CoA} \rightarrow \text{acil-CoA} + \text{AMP}$
 (b) Hidrólise irreversível de PP_i em 2P_i pela pirofosfatase inorgânica na célula.
6. *cis*- Δ^3 -Dodecanoil-CoA; ele é convertido em *cis*- Δ^2 -dodecanoil-CoA e, após, em β -hidroxidodecanoil-CoA.
7. 4 acetil-CoA e 1 propionil-CoA.
8. A resposta é sim. Parte do trício incorporado é removido do palmitato durante as reações de desidrogenação da β -oxidação. O trício removido aparece como água triciada.

9. Os grupos acila de cadeia longa condensados à CoA no citosol são inicialmente transferidos à carnitina, liberando a CoA, e, após, transportados para dentro da mitocôndria, onde são novamente condensados com a CoA. Os conjuntos citosólico e mitocondrial de CoA estão, desse modo, separados, e a CoA radioativa do citosol não entra na mitocôndria.

10. (a) No pombo, a β -oxidação predomina; no faisão, predomina a glicólise anaeróbica usando glicose derivada da degradação do glicogênio. (b) O músculo do pombo consumiria mais O_2 . (c) A gordura contém mais energia por grama que o glicogênio. Além disso, a degradação anaeróbica do glicogênio é limitada pela tolerância do tecido ao aumento de lactato. Assim, o pombo, usando catabolismo oxidativo de gorduras, é o voador de longas distâncias. (d) Essas enzimas são as enzimas regulatórias de suas respectivas vias e, assim, limitam as taxas de produção de ATP.

11. O malonil-CoA não mais inibiria a entrada de ácidos graxos na mitocôndria e a β -oxidação, de modo que poderia ocorrer um ciclo fútil, com síntese de ácidos graxos no citosol e a degradação de ácidos graxos na mitocôndria ocorrendo simultaneamente.

12. (a) A entrada de ácidos graxos na mitocôndria, mediada pela carnitina, é o passo limitante na oxidação de ácidos graxos. A deficiência de carnitina reduz a velocidade de oxidação de ácidos graxos; a carnitina adicionada aumenta essa velocidade. (b) Todas essas condições aumentam a necessidade metabólica de oxidação de ácidos graxos. (c) A deficiência de carnitina poderia resultar de uma deficiência de lisina, seu precursor, ou de um defeito em uma das enzimas da biossíntese de carnitina.

13. A oxidação de gorduras libera água metabólica; 1,4 L de água por kg de tripalmitoilglicerol (ignorando a pequena contribuição do glicerol à massa).

14. As bactérias podem ser usadas para oxidar completamente hidrocarbonetos a CO_2 e H_2O . Contudo, o contato entre os hidrocarbonetos e as enzimas bacterianas pode ser difícil de ser conseguido. Nutrientes bacterianos, como nitrogênio e fósforo, podem ser limitantes, o que inibiria o crescimento.

15. (a) M_r 136; ácido fenilacético. (b) Par; a remoção de dois carbonos por vez a partir de cadeias de número ímpar de carbonos produziria fenilpropionato.

16. Como o conjunto mitocondrial de CoA é pequeno, a CoA deve ser reciclada a partir da acetil-CoA via formação de corpos cetônicos. Isso permite a continuidade da β -oxidação, necessária para a produção de energia.

17. (a) A glicose gera piruvato pela glicólise, e o piruvato é a principal fonte de oxalacetato. Sem glicose na dieta, a [oxalacetato] diminui e o ciclo do ácido cítrico tem sua velocidade reduzida. (b) Número ímpar de carbonos; a conversão de propionato em succinil-CoA fornece intermediários para o ciclo do ácido cítrico e precursores de quatro carbonos para a gliconeogênese.

18. Para o ácido heptanoico, de número ímpar de carbonos, a β -oxidação produz propionil-CoA, que pode ser convertido por uma via de diversos passos em oxalacetato, substrato de partida para a gliconeogênese. O ácido graxo de número par de carbonos não pode ser utilizado na gliconeogênese, pois é inteiramente oxidado em acetil-CoA.

19. A β -oxidação de ω -flúor-oleato forma flúor-acetil-CoA, que entra no ciclo do ácido cítrico e produz flúor-citrato, um poderoso inibidor da aconitase. A inibição da aconitase impede o funcionamento do ciclo do ácido cítrico. Sem os equivalentes redutores produzidos no ciclo do ácido cítrico, a fosforilação oxidativa (síntese de ATP) é reduzida de modo fatal.

20. Ser para Ala: bloqueia a β -oxidação na mitocôndria. Ser para Asp: bloqueia a síntese de ácidos graxos, estimula a β -oxidação.

21. A resposta ao glucagon ou à adrenalina seria prolongada, dada a maior mobilização de ácidos graxos nos adipócitos.

22. Enz-FAD, por ter um potencial de redução padrão mais positivo, é um melhor aceptor de elétrons que o NAD^+ , e a reação é impulsionada no sentido da oxidação de acil-CoA. Esse equilíbrio mais favorável é obtido à custa de 1 ATP; apenas 1,5 ATP é produzido por FADH_2 oxidado na cadeia respiratória (vs. 2,5 por NADH).

23. Nove voltas; o ácido araquidônico, um ácido graxo saturado de 20 carbonos, produz 10 moléculas de acetil-CoA, sendo que as últimas duas são formadas na nona volta.

24. Ver Figura 17-12. $[3\text{-}^{14}\text{C}]$ Succinil-CoA é formado, originando o oxalacetato marcado em C-2 e C-3.

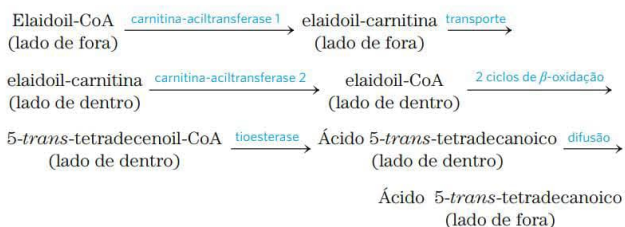
25. Ácido fitânico \rightarrow ácido pristânico \rightarrow propionil-CoA \rightarrow succinil-CoA \rightarrow succinato \rightarrow fumarato \rightarrow malato. Todos os carbonos do malato estariam marcados, mas C-1 e C-4 teriam metade da marcação observada em C-2 e C-3.

26. A hidrólise de ATP nas reações que requerem energia em uma célula consome água na reação $\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}_i$; assim, no equilíbrio estacionário, não há produção líquida de H_2O .

27. A metilmalonil-CoA-mutase requer um cofator que contém cobalto, formado a partir da vitamina B_{12} .

28. A perda de massa por dia é de cerca de 0,66 kg, ou cerca de 140 kg em sete meses. A cetose poderia ser evitada pela degradação de proteína corporal não essencial para fornecer esqueletos carbonados de aminoácidos para a gliconeogênese.

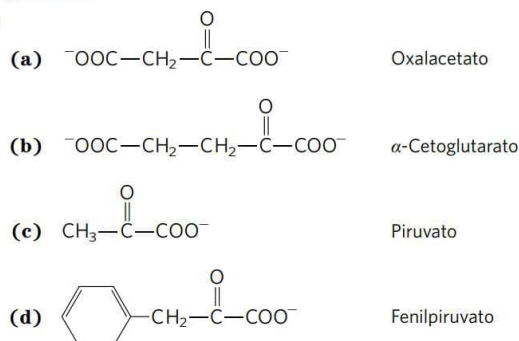
29. (a) Ácidos graxos são convertidos em seus derivados CoA por enzimas na citoplasma; as acil-CoAs são, então, importadas para a mitocôndria para oxidação. Uma vez que os pesquisadores estavam usando mitocôndrias isoladas, eles deveriam usar derivados CoA. **(b)** A estearoil-CoA foi rapidamente convertida em 9 acetil-CoA pela via do β -oxidação. Todos os intermediários reagiram rapidamente, e nenhum deles foi detectável em níveis significativos. **(c)** Duas voltas. Cada volta remove dois átomos de carbono, de modo que duas voltas convertem um ácido graxo de 18 carbonos em um ácido graxo de 14 carbonos e 2 acetil-CoA. **(d)** A K_m é maior para o isômero *trans* do que para o *cis*, de modo que uma concentração maior do isômero *trans* é necessária para uma mesma taxa de degradação. Grosso modo, o isômero *trans* liga-se menos que o *cis* à enzima, provavelmente porque diferenças na forma, embora não no sítio-alvo da enzima, afetem a ligação do substrato à enzima. **(e)** O substrato para LCAD/VLCAD tem sua concentração aumentada de modo diferente, dependendo do substrato em particular; isso é esperado para o passo limitante da velocidade em uma via. **(f)** Os parâmetros cinéticos mostram que o isômero *cis* é um substrato melhor que o *trans* para a LCAD, mas há pouca diferença entre eles no caso da VLCAD. O isômero *trans*, sendo um substrato sobre o qual a enzima atua menos, acumula-se em níveis mais altos que o isômero *cis*. **(g)** Uma via possível é mostrada a seguir (indicando-se o lado “de dentro” e “de fora” da mitocôndria).



(h) É correto no sentido de que as gorduras *trans* são degradadas menos de maneira eficiente que as gorduras *cis*, e, assim, gorduras *trans* podem “vazar” para fora da mitocôndria. É incorreto dizer que gorduras *trans* não são degradadas pelas células; elas são degradadas, porém em uma taxa mais lenta que as gorduras *cis*.

Capítulo 18

1.



2. Este é um teste utilizando reações acopladas. O produto da lenta transaminação (piruvato) é rapidamente consumido na “reação indica-

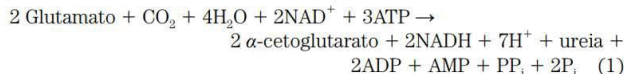
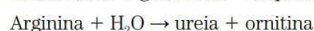
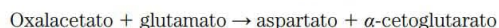
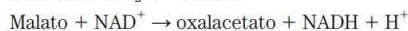
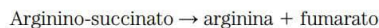
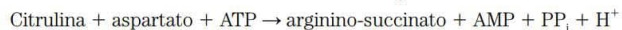
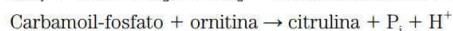
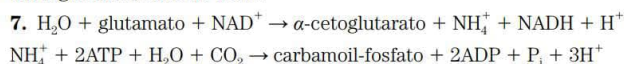
dora” subsequente, catalisada pela lactato-desidrogenase, que consome NADH. Assim, a velocidade de desaparecimento do NADH é uma medida da velocidade da reação da aminotransferase. A reação indicadora é monitorada observando-se a redução na absorção do NADH em 340 nm em um espectrofotômetro.

3. A alanina e a glutamina têm papéis especiais no transporte de grupos amina a partir do músculo e de outros tecidos extra-hepáticos, respectivamente, até o fígado.

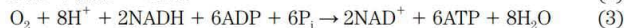
4. Não. O nitrogênio da alanina pode ser transferido para o oxalacetato via transaminação, para formar aspartato.

5. Quinze moles de ATP por mol de lactato; 13 moles de ATP por mol de alanina, quando incluirmos a remoção do nitrogênio.

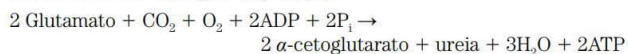
6. (a) O jejum resulta em baixos níveis de glicose no sangue; a administração subsequente da dieta experimental levou ao rápido catabolismo dos aminoácidos glicogênicos. **(b)** A desaminação oxidativa causou um aumento nos níveis de NH_3 ; a ausência de arginina (um intermediário no ciclo da ureia) impediu a conversão de NH_3 em ureia; a arginina não é sintetizada em quantidades suficientes no gato para atingir as demandas impostas pelo estresse do experimento. Isso sugere que a arginina seja um aminoácido essencial na dieta do gato. **(c)** A ornitina é convertida em arginina no ciclo da ureia.



Reações adicionais que devem ser consideradas:



O somatório das equações (1) a (4) dá



8. O segundo grupo amina introduzido na ureia é transferido do aspartato, que é produzido durante a transaminação do glutamato para o oxalacetato, uma reação catalisada pela aspartato-aminotransferase. Aproximadamente metade de todos os grupos amina excretados como ureia devem passar pela reação da aspartato-aminotransferase, o que torna essa enzima a mais ativa das aminotransferases.

9. (a) Uma pessoa em uma dieta consistindo apenas em proteínas deve utilizar aminoácidos como sua principal fonte de combustível metabólico. Uma vez que o catabolismo dos aminoácidos requer a remoção do nitrogênio na forma de ureia, o processo consome quantidades anormalmente elevadas de água para diluir e excretar a ureia na urina. Além disso, eletrólitos na “proteína líquida” devem ser diluídos com água e excretados. Se a perda diária de água através dos rins não estiver equilibrada por uma ingestão suficiente de água, uma perda líquida de água corporal será observada. **(b)** Quando se considera os benefícios nutricionais das proteínas, devemos ter em mente a quantidade total de aminoácidos necessários à síntese proteica e a distribuição dos aminoácidos nas proteínas da dieta. A gelatina contém uma distribuição de aminoácidos que não apresenta um bom equilíbrio nutricional. À medida que grandes quantidades de gelatina são ingeridas e o excesso de aminoácidos é catabolizado, a capacidade do ciclo da ureia pode ser excedida, levando à toxicidade pela amônia. Esse quadro é ainda mais complicado pela desidratação que pode resultar da excreção de grandes quantidades de água. Uma combinação desses dois fatores pode produzir coma e morte.

10. Lisina e leucina.

11. (a) Fenilalanina-hidroxilase; uma dieta com baixo conteúdo de fenilalanina. (b) A via normal do metabolismo da fenilalanina, iniciando com sua hidroxilação para tirosina, está bloqueada, e a fenilalanina acumula-se. (c) A fenilalanina é transformada em fenilpiruvato por transaminação e, então, em fenil-lactato por redução. A reação de transaminação tem uma constante de equilíbrio de 1,0, e o fenilpiruvato é formado em quantidades significativas quando a fenilalanina se acumula. (d) Devido à deficiência na produção de tirosina, que é precursora da melanina, o pigmento normalmente está presente no cabelo.

12. Nem todos os aminoácidos são afetados. O catabolismo dos esqueletos carbonados dos aminoácidos valina, metionina e isoleucina é prejudicado, pois não há uma metilmalonil-CoA-mutase (uma enzima que requer a coenzima B₁₂) funcional. Os efeitos fisiológicos da perda dessa enzima estão descritos na Tabela 18-2 e no Quadro 18-2.

13. A dieta vegana não apresenta vitamina B₁₂, levando ao aumento de homocisteína e metilmalonato (refletindo as deficiências na metionina-sintase e na metilmalonil-CoA-mutase, respectivamente) em indivíduos adeptos dessa dieta por diversos anos. Laticínios fornecem certa quantidade de vitamina B₁₂ na dieta lactovegetariana.

14. As formas genéticas da anemia perniciosa geralmente surgem como resultado de defeitos na via que medeia a absorção de vitamina B₁₂ da dieta (ver Quadro 17-2). Como suplementos dietéticos não são absorvidos no intestino, essas condições são tratadas injetando-se suplementos de B₁₂ diretamente na corrente sanguínea.

15. O mecanismo é idêntico àquele da serina-desidratase (ver Figura 18-20a), exceto que o grupo metila extra da treonina é mantido, produzindo α-cetobutirato, em vez de piruvato.

16. (a) $^{15}\text{NH}_2\text{---CO---}^{15}\text{NH}_2$

(b) $\text{---OO}^{14}\text{C---CH}_2\text{---CH}_2\text{---}^{14}\text{COO}^-$

(c) $\text{R---NH---C(=NH)}^{15}\text{NH}_2$

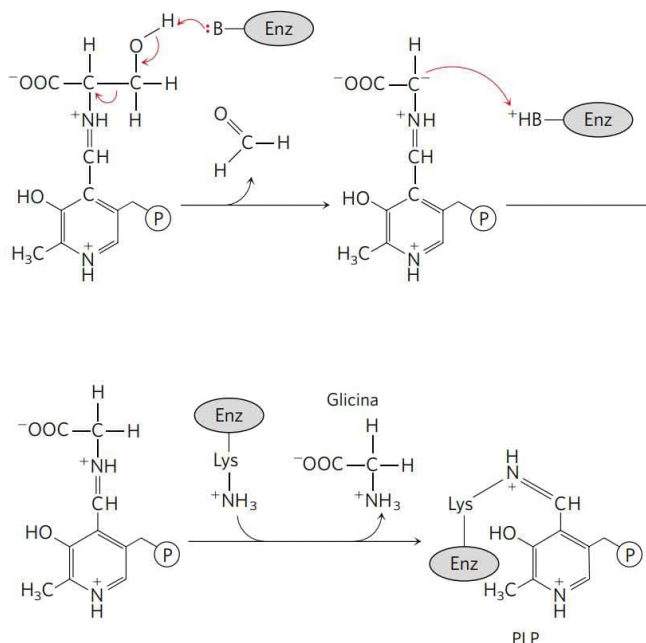
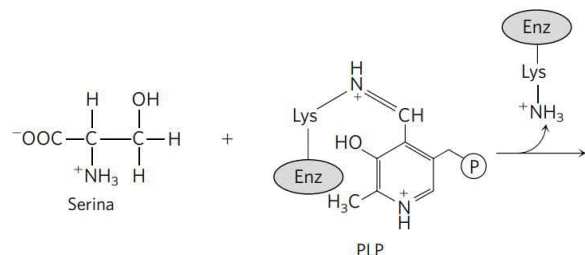
(d) $\text{R---NH---C(=O)}^{15}\text{NH}_2$

(e) Sem marcação

(f) $\text{---OO}^{14}\text{C---CH(}^{15}\text{NH}_2\text{)---CH}_2\text{---}^{14}\text{COO}^-$

17. (a) Isoleucina $\xrightarrow{1}$ II $\xrightarrow{2}$ IV $\xrightarrow{3}$ I $\xrightarrow{4}$ V $\xrightarrow{5}$ III $\xrightarrow{6}$ acetyl-CoA + propionil-CoA (b) Passo 1, transaminação, sem reação análoga, PLP; 2, descarboxilação oxidativa, análoga à reação da piruvato desidrogenase, NAD⁺, TPP, lipoato, FAD; 3, oxidação, análoga à reação da succinato-desidrogenase, FAD; 4, hidratação, análoga à reação da fumarase, sem cofator; 5, oxidação, análoga à reação da malato-desidrogenase, NAD⁺; 6, tiólise (reverso da condensação aldólica), análoga à reação da tiolase, CoA.

18. Um mecanismo provável seria:



O formaldeído (HCHO) produzido na segunda etapa reage rapidamente com o tetra-hidrofolato no centro ativo da enzima, produzindo N⁵, N¹⁰-metilenotetra-hidrofolato (ver Figura 18-17).

19. (a) Transaminação; sem analogias; PLP (b) Descarboxilação oxidativa; análoga à descarboxilação oxidativa do piruvato, produzindo acetil-CoA antes da entrada no ciclo do ácido cítrico, e do α-cetoglutarato para produzir succinil-CoA no ciclo do ácido cítrico; NAD⁺, FAD, lipoato e TPP. (c) Desidrogenação (oxidação); análoga à desidrogenação do succinato em fumarato no ciclo do ácido cítrico e de acil-CoA em enoil-CoA na β-oxidação; FAD. (d) Carboxilação; sem analogias no ciclo do ácido cítrico ou na β-oxidação; ATP e biotina. (e) Hidratação; análoga à hidratação do fumarato para produzir malato no ciclo do ácido cítrico e da enoil-CoA em 3-hidroxiacil-CoA na β-oxidação; sem cofatores. (f) Reversão da reação aldólica; análoga ao reverso da reação da citrato-sintase no ciclo do ácido cítrico; sem cofatores.

20. O catabolismo da maioria dos aminoácidos ocorre no fígado, incluindo os passos-chave que são bloqueados na doença do xarope de bordo. Um transplante de fígado a partir de um doador compatível, com um complexo da desidrogenase dos α-cetoácidos de cadeia ramificada funcionando normalmente, poderia aliviar os sintomas da doença.

21. (a) Leucina; valina; isoleucina. (b) Cisteína (derivada da cistina). Se a cisteína for descarboxilada, como mostrado na Figura 18-6, ela produziria H₂N---CH₂---CH₂---SH, que poderia ser oxidado, produzindo taurina. (c) O teste sanguíneo de janeiro de 1957 mostra níveis significativamente aumentados de isoleucina, leucina, metionina e valina; o teste de urina de janeiro de 1957 mostra níveis significativamente aumentados de isoleucina, leucina, taurina e valina. (d) Todos os pacientes apresentaram níveis elevados de isoleucina, leucina e valina, tanto no sangue quanto na urina, sugerindo um defeito na via de degradação desses aminoácidos. Uma vez que a urina também continha níveis altos das formas de alfa-cetoácidos desses três aminoácidos, o bloqueio na via deve estar após a desaminação, mas previamente à desidrogenação (como mostrado na Figura 18-28). (e) O modelo não explica os altos níveis de metionina no sangue e de taurina na urina. Os níveis elevados de taurina podem ser devidos à morte neuronal durante os estágios finais da doença. No entanto, a razão para os níveis aumentados de metionina no sangue não está clara; a via de degradação de metionina não está ligada à degradação dos aminoácidos de cadeia ramificada. O aumento na metionina poderia ser um efeito secundário do aumento nos demais aminoácidos. É importante ter em mente que as amostras de janeiro de 1957 eram de um indivíduo que estava morrendo, de modo que a comparação de testes de sangue e de urina com aqueles de um indivíduo saudável pode não ser adequada. (f) As seguintes informações são

necessárias (e, por fim, foram obtidas por outros pesquisadores): (1) a atividade da desidrogenase está significativamente reduzida ou ausente em indivíduos com a doença do xarope de bordo. (2) A doença é herdada como um defeito em gene único. (3) O defeito ocorre em um gene que codifica toda ou parte da desidrogenase. (4) O defeito genético leva à produção da enzima inativa.

Capítulo 19

1. Reação 1: (a), (d) NADH; (b), (e) E-FMN; (c) NAD^+/NADH e E-FMN/FMNH₂

Reação 2: (a), (d) E-FMNH₂; (b), (e) Fe^{3+} ; (c) E-FMN/FMNH₂ e $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$

Reação 3: (a), (d) Fe^{2+} ; (b), (e) Q; (c) $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ e Q/QH₂

2. A cadeia lateral torna a ubiquinona solúvel em lipídeos e permite que ela se difunda na membrana semifluida.

3. A partir da diferença no potencial de redução padrão (ΔE°) para cada par de hemirreações, podemos calcular ΔG° . A oxidação do succinato pelo FAD é favorecida pela variação de energia livre padrão negativa ($\Delta G^\circ = -3,7 \text{ kJ/mol}$). A oxidação pelo NAD^+ implicaria em uma variação de energia livre padrão muito grande e positiva ($\Delta G^\circ = 68 \text{ kJ/mol}$).

4. (a) Todos os carreadores reduzidos; CN^- bloqueia a redução do O_2 catalisada pela citocromo-oxidase. **(b)** Todos os carreadores reduzidos; na ausência de O_2 , os carreadores reduzidos não são reoxidados. **(c)** Todos os carreadores oxidados. **(d)** Carreadores iniciais mais reduzidos; carreadores mais para o final da cadeia mais oxidados.

5. (a) A inibição da NADH-desidrogenase pela rotenona diminui a velocidade do fluxo de elétrons pela cadeia respiratória, o que, por sua vez, diminui a velocidade da produção de ATP. Se essa velocidade reduzida for insuficiente para atender às necessidades de ATP do organismo, ele morre. **(b)** A antimicina A inibe fortemente a oxidação de Q na cadeia respiratória, reduzindo a velocidade de transferência de elétrons e levando às consequências descritas em (a). **(c)** Uma vez que a antimicina A bloqueia *toda* o fluxo de elétrons para o oxigênio, ela é um veneno mais potente que a rotenona, que bloqueia o fluxo de elétrons a partir do NADH, mas não a partir do FADH_2 .

6. (a) A velocidade de transferência de elétrons necessária para satisfazer a demanda de ATP aumenta, e, assim, a razão P/O diminui. **(b)** Altas concentrações do desacoplador produzem razões P/O próximas de zero. A razão P/O diminui, e mais combustível deve ser oxidado para gerar a mesma quantidade de ATP. O calor extra gerado por essa oxidação eleva a temperatura corporal. **(c)** O aumento na atividade da cadeia respiratória na presença de um desacoplador requer a degradação de combustível adicional. Pela oxidação de maior quantidade de combustível (incluindo reservas de gordura) para produzir a mesma quantidade de ATP, o corpo perde peso. Quando a razão P/O se aproxima de zero, a falta de ATP resulta em morte.

7. A valinomicina atua como desacoplador. Ela combina-se com o K^+ para formar um complexo que atravessa a membrana mitocondrial interna, dissipando o potencial de membrana. A síntese de ATP diminui, o que aumenta a velocidade de transferência de elétrons. Isso resulta em um aumento no gradiente de H^+ , consumo de O_2 e na quantidade de calor liberado.

8. A concentração de P_i em equilíbrio estacionário na célula é muito maior que aquela de ADP. O P_i liberado pela hidrólise de ATP muda muito pouco a $[\text{P}_i]$ total.

9. A transferência de elétrons entre complexos é mais eficiente.

10. (a) Meio externo: $4,0 \times 10^{-8} \text{ M}$; matriz: $2,0 \times 10^{-8} \text{ M}$. **(b)** O gradiente de $[\text{H}^+]$ contribui com $1,7 \text{ kJ/mol}$ para a síntese de ATP. **(c)** 21. **(d)** Não. **(e)** Do potencial transmembrana global.

11. (a) $0,91 \mu\text{mol/s} \cdot \text{g}$. **(b)** $5,5 \text{ s}$; para fornecer um nível constante de ATP, a regulação da produção de ATP deve ser bem ajustada e rápida.

12. $53 \mu\text{mol/s} \cdot \text{g}$. Com uma $[\text{ATP}]$ no estado estacionário de $7,0 \mu\text{mol/g}$, isso é equivalente a 10 renovações do conjunto de ATP por segundo; a reserva deveria durar cerca de 0,13 s.

13. O ciclo do ácido cítrico é interrompido por falta de um aceptor de elétrons a partir do NADH. O piruvato produzido pela glicólise não pode entrar no ciclo como acetil-CoA; o piruvato acumula-se e é transaminado, produzindo alanina, que é exportada para o fígado.

14. A malato-desidrogenase citosólica tem um papel central no transporte de equivalentes redutores através da membrana interna da mitocôndria via lançadeira do malato-aspartato.

15. A membrana mitocondrial interna é impermeável ao NADH, mas os equivalentes redutores do NADH são transferidos (lançados) através da membrana de modo indireto: eles são transferidos para o oxalacetato no citosol, o malato resultante é transportado para a matriz e o NAD^+ mitocondrial é reduzido a NADH.

16. A piruvato-desidrogenase está localizada na mitocôndria; a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, no citosol. Os conjuntos de NAD são separados pela membrana mitocondrial interna.

17. (a) A glicólise torna-se anaeróbica. **(b)** O consumo de oxigênio cessa. **(c)** A formação de lactato aumenta. **(d)** A síntese de ATP diminui para 2 ATP/glicose.

18. A resposta para (a), $[\text{ADP}]$ aumentada, é mais rápida, pois a resposta para (b), pO_2 reduzida, requer síntese proteica.

19. (a) NADH é reoxidado via transferência de elétrons, em vez de por fermentação láctica. **(b)** A fosforilação oxidativa é mais eficiente. **(c)** A alta razão de massas do sistema do ATP inibe a fosfofrutocinase 1.

20. A fermentação a etanol poderia ser realizada na presença de O_2 , o que é uma vantagem, pois condições anaeróbicas estritas são difíceis de manter. O efeito Pasteur não é observado, pois o ciclo do ácido cítrico e a cadeia respiratória estão inativos.

21. Espécies reativas de oxigênio reagem com macromoléculas, incluindo o DNA. Se um defeito mitocondrial levar a uma produção aumentada de ERO, proto-oncogenes nos cromossomos nucleares podem ser danificados, produzindo oncogenes e levando à divisão celular desregulada e ao câncer (ver Seção 12.11).

22. Graus de heteroplasma distintos para o gene defeituoso produzem diferentes graus de prejuízo da função mitocondrial.

23. A falta completa de glicocinase (dois alelos defeituosos) torna impossível realizar a glicólise em uma velocidade suficiente para aumentar a $[\text{ATP}]$ até o limiar necessário para a secreção de insulina.

24. Defeitos no Complexo II resultam em aumento na produção de ERO, lesão no DNA e mutações que levam à divisão celular desregulada (câncer; ver Seção 12.11). Não está esclarecida a razão pela qual o câncer tende a ocorrer no intestino médio.

25. (a) DNF é um desacoplador; ele lança prótons através das membranas, impedindo a geração de um grande gradiente de prótons, o que, de outro modo, impediria o fluxo de elétrons. O_2 ainda pode ser reduzido. **(b)** A ATP-sintase, não a cadeia respiratória, é afetada, pois a transferência de elétrons ocorre na presença de um desacoplador (DNF) e do inibidor (DCCD). **(c)** Em fragmentos de membrana, não há gradiente de prótons para propiciar a síntese de ATP; a enzima atua no sentido reverso, hidrolisando ATP e bombeando prótons. **(d)** Apenas alterada. Se a proteína sensível à DCCD estivesse completamente ausente, esperaríamos que o mutante crescesse muito pouco, se é que cresceria, sob condições aeróbicas, e que tivesse pouca ou nenhuma atividade de ATPase. **(e)** Observe se há atividade ATPásica insensível à DCCD nos sistemas reconstituídos híbridos; aquele componente que foi fornecido pelo mutante RF-7 é a fonte da proteína. (Por sua vez, observe se há atividade ATPásica sensível à DCCD nos sistemas reconstituídos híbridos; aquele componente fornecido pelas células do tipo selvagem [sem mutação] é a fonte da proteína.) **(f)** Ele buscou frações (fatias do gel) que estivessem marcadas (reagiram com DCCD) nas amostras do tipo selvagem, mas não nas amostras mutantes. **(g)** A obtenção dos mesmos resultados quando utilizando as membranas desprovidas de suas proteínas periféricas permitiu que ele confirmasse que a proteína sensível à DCCD não estava na fração solúvel com a atividade ATPásica. Ela estava fortemente associada à membrana, confirmando os resultados dos experimentos de reconstituição com híbridos. **(h)** Esperar-se-ia que uma

proteína de 9 kDa tivesse cerca de 80 resíduos. Sua solubilidade em clorofórmio/metanol indica um conteúdo muito alto de resíduos hidrofóbicos, sugerindo que ela esteja basicamente embebida na membrana. Cerca de 20 resíduos são necessários para uma α -hélice transmembrana, de modo que uma proteína de 80 resíduos provavelmente teria menos que quatro hélices transmembrana. **(i)** Com 40 resíduos separando Ala²¹ e Asp⁶¹, esses dois resíduos poderiam situar-se próximos um ao outro em distintas hélices transmembrana. A substituição de uma cadeia lateral polar de Ser no resíduo 21 poderia interferir com o ataque da DCCD sobre o Asp⁶¹. **(j)** A proteína sensível à DCCD era a subunidade c que constitui o motor rotatório no complexo F_o.

Capítulo 20

1. Para a taxa fotossintética máxima, o PSI (que absorve luz de 700 nm) e o PSII (que absorve luz de 680 nm) devem operar simultaneamente.
2. Vem da água consumida na reação global.
3. H₂S é o doador de hidrogênios na fotossíntese. Não há produção de O₂, pois o fotossistema único não apresenta o complexo de quebra de água.
4. 0,44
5. **(a)** O fluxo cessa. **(b)** A velocidade diminui; um certo fluxo de elétrons ainda ocorre pela via cíclica.
6. Sob iluminação, é estabelecido um gradiente de prótons. Quando ADP e P_i são adicionados, a síntese de ATP é possibilitada pela energia do gradiente, que é exaurido na ausência de luz.
7. O DCMU bloqueia a transferência de elétrons entre PSII e o primeiro sítio de produção de ATP.
8. A venturicidina bloqueia o movimento de prótons através do complexo CF₁CF₀; o fluxo de elétrons (com produção de O₂) continua apenas até que o custo de energia livre do bombeamento de prótons contra um gradiente de prótons que aumenta se iguale à energia livre disponível em um fóton. O DNP, ao dissipar o gradiente de prótons, restaura o fluxo de elétrons e a produção de O₂.
9. **(a)** 56 kJ/mol **(b)** 0,29 V
10. A partir da diferença nos potenciais de redução, você pode calcular $\Delta G^\circ = 15$ kJ/mol para a reação *redox*. A Figura 20-7 mostra que a energia dos fótons em qualquer região do espectro visível é mais que suficiente para propiciar esta reação endoergônica.
11. $1,35 \times 10^{-77}$; a reação é altamente desfavorável. Nos cloroplastos, o fornecimento de energia pela luz ultrapassa esta barreira.
12. -920 kJ/mol
13. Não. Os elétrons da H₂O fluem para o aceptor artificial de elétrons, Fe³⁺, e não para o NADP⁺.
14. Cerca de uma vez a cada 0,1 s; 1 em 10⁸ ficam excitadas.
15. Luz de 700 nm excita PSI, mas não PSII; os elétrons fluem do P700 para o NADP⁺, mas não ocorre fluxo de elétrons do P680 para substituí-los. Quando luz de 680 nm excita PSII, os elétrons tendem a fluir para PSI, mas os carregadores de elétrons entre os dois fotossistemas rapidamente se tornam completamente reduzidos.
16. Não. O elétron excitado de P700 retorna para repor o "buraco" eletrônico criado pela iluminação. O PSII não é necessário para suprir elétrons, e não há produção de O₂ a partir de H₂O. Não há produção de NADPH, pois o elétron excitado retorna ao P700.
17. Em organelas, as concentrações de enzimas e metabólitos específicos estão elevadas; são mantidos conjuntos separados de cofatores e intermediários; mecanismos regulatórios afetam apenas um conjunto de enzimas e de metabólitos.
18. ATP e NADPH são gerados quando da exposição à luz e são essenciais para a fixação de CO₂; a conversão para na medida em que o suprimento de ATP e NADPH são exauridos. Algumas enzimas são desativadas no escuro.
19. X é o 3-fosfoglicerato; Y é a ribulose-1,5-bisfosfato.

20. Ribulose-5-fosfato-cinase, frutose-1,6-bisfosfatase, sedoheptulose-1,7-bisfosfatase e gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase; todas são ativadas pela redução de uma ligação dissulfeto crucial, produzindo duas sulfidrilas; o iodoacetato reage irreversivelmente com sulfidrilas livres.

21. A via redutora das pentoses-fosfato regenera ribulose-1,5-bisfosfato a partir das trioses-fosfato produzidas durante a fotossíntese. A via oxidativa das pentoses-fosfato fornece NADPH para vias redutoras de biossíntese e pentoses-fosfato para síntese de nucleotídeos.

22. Ambos os tipos de "respiração" ocorrem em plantas, consomem O₂ e produzem CO₂. (A respiração mitocondrial também ocorre em animais.) A respiração mitocondrial ocorre continuamente, principalmente à noite ou em dias nublados; os elétrons derivados de vários combustíveis passam através de uma cadeia de transporte na membrana mitocondrial interna até chegarem ao O₂. A fotorrespiração ocorre nos cloroplastos, nos peroxissomos e nas mitocôndrias durante o período diurno, quando ocorre a fixação fotossintética de carbono. O fluxo de elétrons na fotorrespiração é mostrado na Figura 20-48; aquele da respiração mitocondrial é mostrado na Figura 19-19.

23. (a) Sem produção de NADPH pela via das pentoses-fosfato, as células seriam incapazes de sintetizar lipídeos ou outros produtos reduzidos. **(b)** Sem a geração de ribulose-1,5-bisfosfato, o ciclo de Calvin seria efetivamente bloqueado.

24. No milho, o CO₂ é fixado pela via C₄ (Hatch-Slack), em que o PEP é rapidamente carboxilado a oxalacetato (parte das moléculas de oxalacetato sofre transaminação a aspartato) e a seguir reduzido a malato. Apenas após a descarboxilação subsequente é que o CO₂ entra no ciclo de Calvin.

25. Medir a taxa de fixação de ¹⁴CO₂ quando da exposição à luz (período diurno) e no escuro. Maior fixação no escuro identifica uma planta CAM. Você também poderia determinar a acidez por titulação; ácidos armazenados no vacúolo durante a noite podem ser quantificados desse modo.

26. Reação da isocitrato-desidrogenase.

27. Espécie 1, C₄; espécie 2, C₃.

28. (a) Cloroplastos periféricos. **(b), (c)** Região central (em vermelho).

29. O armazenamento consome 1 mol de ATP por mol de glicose-6-fosfato, ou 3,3% do total de ATP disponível a partir do metabolismo da glicose-6-fosfato (i.e., a eficiência do armazenamento é de 96,7%).

30. A [PP_i] é alta no citosol porque este não possui pirofosfatase inorgânica.

31. (a) Baixa [P_i] no citosol e alta [triose-fosfato] no cloroplasto. **(b)** Alta [triose-fosfato] no citosol.

32. 3-Fosfoglicerato é o principal produto da fotossíntese; a [P_i] aumenta quando diminui a síntese de ATP promovida pela luz, a partir de ADP e P_i.

33. (a) Sacarose + (glicose)_n → (glicose)_{n+1} + frutose. **(b)** A frutose gerada na síntese de dextrana é facilmente importada e metabolizada pela bactéria.

34. A primeira enzima de cada via está sob regulação alostérica recíproca. A inibição de uma via desloca o isocitrato para a outra via.

35. (a) (1) A presença de Mg²⁺ dá suporte à hipótese de que a clorofila está diretamente envolvida na catálise da reação de fosforilação, ADP + P_i → ATP. (2) Muitas enzimas (ou outras proteínas) que contêm Mg²⁺ não são enzimas de fosforilação, de modo que a presença de Mg²⁺ na clorofila não comprova seu papel em reações de fosforilação. (3) A presença de Mg²⁺ é essencial para as propriedades fotoquímicas da clorofila: absorção de luz e transferência de elétrons. **(b)** (1) Enzimas catalisam reações reversíveis, de modo que uma enzima isolada que, sob certas condições de laboratório, catalisa a remoção de um grupo fosforila provavelmente poderia, sob diferentes condições (como aquelas dentro da célula), catalisar a adição de um grupo fosforila. Assim, a clorofila poderia estar envolvida na fosforilação do ADP. (2) Há duas explicações possíveis: a proteína com a clorofila é uma fosfatase apenas e não catalisa a fosforilação do ADP nas condições celulares, ou a pre-

paração não purificada está contaminada com uma atividade fosfatásica que não está relacionada às reações fotossintéticas. (3) A preparação provavelmente estava contaminada com uma atividade fosfatásica não fotossintética. **(c)** (1) Essa inibição pela luz seria esperada se a proteína que contém a clorofila catalisasse a reação $\text{ADP} + \text{P}_i + \text{luz} \rightarrow \text{ATP}$. Sem luz, a reação reversa, uma desfosforilação, seria favorecida. Na presença de luz, a energia é fornecida e o equilíbrio seria deslocado para a direita, reduzindo a atividade fosfatásica. (2) Essa inibição deve ser um artefato dos métodos de isolamento ou de ensaio. (3) Os métodos utilizados na época para obter a preparação não purificada provavelmente não preservavam intactas as membranas do cloroplasto, de modo que a inibição deve ser um artefato. **(d)** Na presença de luz, (1) ATP é sintetizado e outros intermediários fosforilados são consumidos; (2) glicose é produzida e metabolizada pela respiração celular para produzir ATP, com mudanças nos níveis de intermediários fosforilados; (3) ATP é produzido e outros intermediários fosforilados são consumidos. **(e)** A energia luminosa é usada para produzir ATP (como no modelo de Emerson) e é utilizada também para produzir poder redutor (como no modelo de Rabinowitch). **(f)** A estequiometria aproximada para a fotofosforilação é de 8 fótons para produzir 2 NADPH e cerca de 3 ATP. Dois NADPH e 3 ATP são necessários para reduzir 1 CO_2 . Assim, no mínimo 8 fótons são necessários por molécula de CO_2 reduzida, em concordância com o valor de Rabinowitch. **(g)** Uma vez que a energia luminosa é utilizada para produzir *ambos*, ATP e NADPH, cada fóton absorvido contribui para produzir mais de 1 ATP na fotossíntese. O processo de extração de energia da luz é mais eficiente do que supunha Rabinowitch, e grandes quantidades de energia estão disponíveis para este processo – mesmo com luz vermelha.

Capítulo 21

1. **(a)** Os 16 carbonos do palmitato são derivados dos 8 grupos acetila de 8 moléculas de acetil-CoA. A acetil-CoA marcada com ^{14}C origina malonil-CoA marcada em C-1 e C-2. **(b)** O conjunto metabólico de moléculas de malonil-CoA, a fonte de todos os carbonos do palmitato, com exceção de C-16 e C-15, não se torna marcado com pequenas quantidades de acetil-CoA marcada com ^{14}C . Assim, apenas palmitato [$15,16\text{-}^{14}\text{C}$] é formado.

2. Ambas, glicose e frutose, são degradadas a piruvato na glicólise. O piruvato é convertido em acetil-CoA pelo complexo da piruvato-desidrogenase. Parte dessa acetil-CoA entra no ciclo do ácido cítrico, que produz equivalentes redutores, NADH e NADPH. A transferência mitocondrial de elétrons para o O_2 produz ATP.

3. $8 \text{ Acetil-CoA} + 15\text{ATP} + 14\text{NADPH} + 9\text{H}_2\text{O} \rightarrow$
palmitato + $8\text{CoA} + 15\text{ADP} + 15\text{P}_i + 14\text{NADP}^+ + 2\text{H}^+$

4. **(a)** Três deutérios por palmitato; todos localizados em C-16; todas as demais unidades de dois carbonos são derivadas da malonil-CoA não marcada. **(b)** Sete deutérios por palmitato; localização em todos os carbonos de número *par*, exceto C-16.

5. Utilizando a unidade de três carbonos malonil-CoA, a forma ativada da acetil-CoA (lembre-se de que a síntese de malonil-CoA requer ATP), o metabolismo é deslocado no sentido da síntese de ácidos graxos pela liberação exergônica de CO_2 .

6. O passo limitante de velocidade na síntese de ácidos graxos é a carboxilação da acetil-CoA, catalisada pela acetil-CoA-carboxilase. Altas [citrato] e [isocitrato] indicam que as condições são favoráveis para a síntese de ácidos graxos: o ciclo do ácido cítrico ativo está fornecendo um suprimento pleno de ATP, nucleotídeos pirimidínicos reduzidos e acetil-CoA. O citrato estimula (aumenta a $V_{\text{máx}}$) a acetil-CoA-carboxilase **(a)**. Uma vez que o citrato se liga mais fortemente à forma filamentosa (ativa) da enzima, a alta [citrito] desloca o equilíbrio promotor \rightleftharpoons filamento no sentido da forma ativa **(b)**. Em contrapartida, palmitoil-CoA (o produto final da síntese de ácidos graxos) desloca o equilíbrio no sentido da forma inativa (protômero). Assim, quando o produto final da síntese de ácidos graxos se acumula, a via biossintética tem sua velocidade diminuída.

7. **(a)** $\text{Acetil-CoA}_{(\text{mit})} + \text{ATP} + \text{CoA}_{(\text{cit})} \rightarrow \text{acetil-CoA}_{(\text{cit})} + \text{ADP} + \text{P}_i + \text{CoA}_{(\text{mit})}$. **(b)** 1 ATP por grupo acetila. **(c)** Sim.

8. A ligação dupla no palmitoleato é introduzida por uma oxidação catalisada pela acil-CoA-dessaturase, uma oxidase de função mista que requer O_2 como cossubstrato.

9. $3 \text{ Palmitato} + \text{glicerol} + 7\text{ATP} + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow$
tripalmitina + $7\text{ADP} + 7\text{P}_i + 7\text{H}^+$

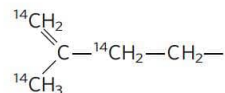
10. Em ratos adultos, triacilgliceróis armazenados são mantidos em estado estacionário por meio de um equilíbrio das velocidades de degradação e síntese. Assim, os triacilgliceróis do tecido adiposo (gordura) estão constantemente sendo renovados, o que explica a incorporação da marcação com ^{14}C a partir da glicose da dieta.

11. Reação global:

$\text{Di-hidroxiacetona-fosfato} + \text{NADH} + \text{palmitato} + \text{oleato} +$
 $3\text{ATP} + \text{CTP} + \text{colina} + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow$
fosfatidilcolina + $\text{NAD}^+ + 2\text{AMP} + \text{ADP} + \text{H}^+ + \text{CMP} + 5\text{P}_i$
7ATP por molécula de fosfatidilcolina

12. A deficiência de metionina reduz os níveis de adoMet, necessário para a síntese *de novo* de fosfatidilcolina. A via de recuperação não emprega adoMet, mas usa a colina disponível. Desse modo, a fosfatidilcolina pode ser sintetizada mesmo quando a dieta é deficiente em metionina, desde que haja colina disponível.

13. A marcação com ^{14}C aparece em três lugares no isopreno ativado:



14. **(a)** ATP. **(b)** UDP-glicose. **(c)** CDP-etanolamina. **(d)** UDP-galactose. **(e)** Acil-CoA-graxo. **(f)** S-Adenosilmetionina. **(g)** Malonil-CoA. **(h)** Δ^3 -Isopentenil-pirofosfato.

15. O linoleato é necessário na síntese de prostaglandinas. Os animais não podem transformar oleato em linoleato, de modo que o linoleato é um ácido graxo essencial. Os vegetais podem converter oleato em linoleato e fornecem aos animais o linoleato necessário (ver Figura 21-12).

16. O passo determinante da velocidade na biossíntese do colesterol é a síntese de mevalonato, catalisado pela HMG-CoA-redutase. Essa enzima é regulada alostericamente por mevalonato e por derivados do colesterol. Alta [colesterol] intracelular também reduz a transcrição do gene que codifica a HMG-CoA-redutase.

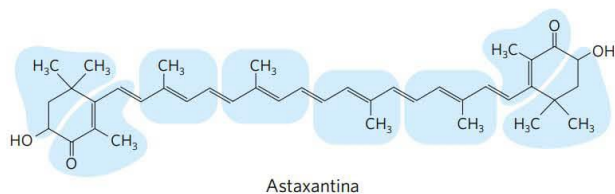
17. Quando os níveis de colesterol declinam devido ao tratamento com uma estatina, as células tentam compensar por meio do aumento da expressão do gene que codifica a HMG-CoA-redutase; contudo, as estatinas são bons inibidores competitivos da atividade da HMG-CoA-redutase e reduzem a produção geral de colesterol.

18. Nota: na ausência de conhecimento detalhado da literatura acerca dessa enzima, os estudantes poderiam propor diversas alternativas plausíveis. *Reação da tiolase*: inicia com ataque nucleofílico de um resíduo de Cys no sítio ativo sobre a primeira molécula de acetil-CoA substrato, deslocando a $-\text{S-CoA}$ e formando uma ligação covalente tioéster entre a Cys e o grupo acetila. Uma base na enzima, então, extrai um próton do grupo metila da segunda acetil-CoA, deixando um carbânion, que ataca o carbono da carbonila do tioéster formado na primeira etapa. A sulfidríla do resíduo de Cys é deslocada, criando o produto acetoacetil-CoA. *Reação da HMG-CoA-sintase*: começa do mesmo modo, com a formação de uma ligação covalente tioéster entre o resíduo de Cys da enzima e o grupo acetila da acetil-CoA, com o deslocamento da $-\text{S-CoA}$. A $-\text{S-CoA}$ dissocia-se como CoA-SH , e a acetoacetil-CoA liga-se à enzima. Um próton é abstraído do grupo metila da acetila ligada à enzima, formando um carbânion, que ataca a carbonila cetônica do substrato acetoacetil-CoA. A carbonila é convertida em um íon hidroxila nesta reação, o qual é protonado para criar $-\text{OH}$. A ligação tioéster com a enzima é, então, clivada hidroliticamente para gerar o produto HMG-CoA. *Reação da HMG-CoA-redutase*: dois íons hidreto sucessivos provenientes do NADPH primeiro deslocam o grupo $-\text{S-CoA}$, e, então, reduzem o aldeído a um grupo hidroxila.

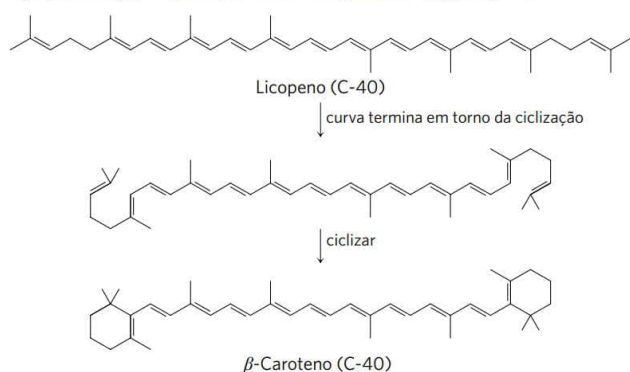
19. As estatinas inibem a HMG-CoA-redutase, uma enzima da via de síntese de unidades isopreno ativadas, que são precursores do coles-

terol e de uma grande variedade de isoprenoides, incluindo a coenzima Q (ubiquinona). Assim, as estatinas podem reduzir os níveis de coenzima Q disponível para a respiração mitocondrial. A ubiquinona é obtida da dieta assim como de biossíntese direta, mas não está claro qual a quantidade necessária e quão adequadamente as fontes da dieta podem compensar uma síntese reduzida. Reduções nos níveis de certos isoprenoides podem explicar alguns efeitos colaterais das estatinas.

20. (a)



(b) Cabeça a cabeça. Há duas formas de se considerar isso. Primeiro, a “cauda” do geranyl-geranyl-pirofosfato tem uma estrutura ramificada dimetila, assim como ambas as extremidades do fitoeno. Segundo, nenhuma —OH livre é formada pela liberação de PP_i, indicando que os dois —O—P—P— “cabeças” estão unidos para formar fitoeno. (c) Quatro ciclos de desidrogenação convertem quatro ligações simples em ligações duplas. (d) Não. Uma contagem de ligações simples e duplas na reação a seguir mostra que uma ligação dupla é substituída por duas ligações simples — assim, não há oxidação ou redução líquidas:



(e) Etapas 1 a 3. A enzima pode converter IPP e DMAP em geranyl-geranyl-pirofosfato, mas não catalisa outras reações sucessivas na via, como confirmado pelos resultados com outros substratos. (f) As linhagens 1 a 4 não têm *crtE* e apresentam produção muito menor de astaxantina quando comparadas com as linhagens 5 a 8, as quais superexpressam *crtE*. Assim, a superexpressão de *crtE* leva a um aumento substancial na produção de astaxantina. *E. coli* do tipo selvagem tem alguma atividade na etapa 3, mas esta conversão de farnesil-pirofosfato em geranylgeranyl-pirofosfato é notavelmente limitada pela velocidade. (g) IPP-isomerase. Comparando as linhagens 5 e 6, observa-se que a adição de *ispA*, que catalisa as etapas 1 e 2, tem pouco efeito sobre a produção de astaxantina, de modo que esses passos não são limitados pela velocidade. Contudo, comparando as linhagens 5 e 7, observa-se que a adição de *idi* aumenta substancialmente a produção de astaxantina, de modo que a IPP-isomerase deve ser um passo limitado pela velocidade quando *crtE* é superexpressa. (h) Um nível baixo (+), comparável às linhagens 5, 6 e 9. Sem a superexpressão de *idi*, a produção de astaxantina é limitada pela baixa atividade da IPP-isomerase e pelo resultante suprimento limitado de IPP.

Capítulo 22

1. Na sua relação simbiótica com as plantas, as bactérias fornecem íons amônio pela redução do nitrogênio atmosférico, um processo que requer grandes quantidades de ATP.

2. A transferência de nitrogênio do NH₃ para esqueletos carbonados pode ser catalisada por (1) glutamina-sintetase e (2) glutamato-desi-

drogenase. A última enzima produz glutamato, o doador do grupo amina em todas as reações de transaminação, necessário para a formação de aminoácidos para a síntese proteica.

3. Uma ligação é formada entre o PLP ligado à enzima e o substrato da fosfo-homoserina, com um rearranjo para gerar a cetimina no carbono α do substrato. Isso ativa o carbono β por abstração de prótons, levando ao deslocamento do fosfato e à formação de uma ligação dupla entre os carbonos β e γ. Um rearranjo (começando com a abstração de prótons no carbono piridoxal adjacente ao nitrogênio amina do substrato) move a ligação dupla α-β e converte a cetimina na forma aldimina do PLP. O ataque da água ao carbono β é, então, facilitado pelo piridoxal ligado, seguido pela hidrólise da ligação imina entre o PLP e o produto, para gerar treonina.

4. Na rota de mamíferos, os íons amônio tóxicos são transformados em glutamina, reduzindo os efeitos tóxicos no cérebro.

5. Glicose + 2CO₂ + 2NH₃ → 2 aspartato + 2H⁺ + 2H₂O

6. O domínio aminoterminal da glutaminase é semelhante em todas as glutamina-amidotransferases. Um fármaco que atinja o seu sítio ativo provavelmente inibiria muitas enzimas e, assim, produziria muito mais efeitos colaterais do que um inibidor mais específico que atingisse a porção carboxiterminal única do sítio ativo da sintase.

7. Se a fenilalanina-hidroxilase estiver defeituosa, a rota de biossíntese da tirosina é bloqueada, e a tirosina deve ser obtida a partir da dieta.

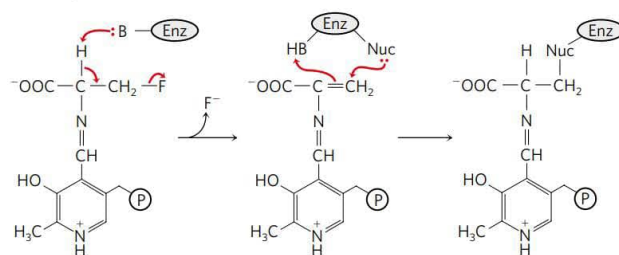
8. Na síntese de adoMet, o trifosfato é liberado a partir do ATP. A hidrólise do trifosfato torna a reação termodinamicamente mais favorável.

9. Se a inibição da glutamina-sintase não for revertida, a histidina em concentrações saturantes parará a enzima e interromperá a produção de glutamina, que a bactéria precisa para sintetizar outros produtos.

10. O ácido fólico é um precursor de tetra-hidrofolato (ver Figura 18-16), necessário na biossíntese de glicina (ver Figura 22-14), um precursor das porfirinas. Portanto, a deficiência de ácido fólico prejudica a síntese de hemoglobina.

11. Para auxotróficos em glicina: adenina e guanina; para auxotróficos em glutamina: adenina, guanina e citosina; para auxotróficos em aspartato: adenina, guanina, citosina e uridina

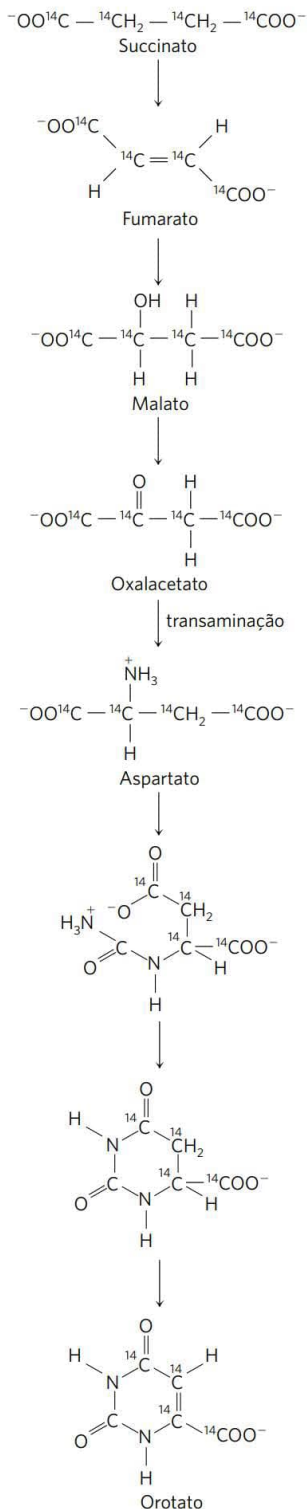
12. (a) Ver Figura 18-6, etapa 2, para o mecanismo da racemização de aminoácidos. O átomo F da fluoroalanina é um excelente grupo de saída. A fluoroalanina causa inibição irreversível (covalente) da alanina-racemase. Um mecanismo plausível é (onde Nuc representa qualquer cadeia lateral de aminoácidos nucleofílicos no sítio ativo da enzima):



(b) A azaserina (ver Figura 22-51) é um análogo da glutamina. O grupo diazoacetil é altamente reativo e forma ligações covalentes com nucleófilos no sítio ativo da glutamina-amidotransferase.

13. (a) Como mostrado na Figura 18-16, *p*-aminobenzoato é um componente de N⁵, N¹⁰-metilenotetra-hidrofolato, o cofator envolvido na transferência de uma unidade de carbono. (b) Na presença da sulfanilamida, um análogo estrutural do *p*-aminobenzoato, as bactérias não sintetizam tetra-hidrofolato, um cofator necessário para converter AICAR em FAICAR; portanto, AICAR acumula-se. (c) A inibição competitiva pela sulfanilamida da enzima envolvida na biossíntese de tetra-hidrofolato é revertida pela adição de excesso de substrato (*p*-aminobenzoato).

14. O ^{14}C -orotato provém da seguinte via (as três primeiras etapas são parte do ciclo do ácido cítrico):

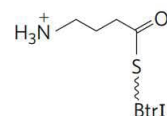


15. Os organismos não armazenam nucleotídeos para serem usados como combustível e não os degradam completamente, mas os hidrolisam para liberar as bases, as quais podem ser recuperadas em vias de recuperação. A baixa proporção C:N dos nucleotídeos faz deles fontes pobres em energia.

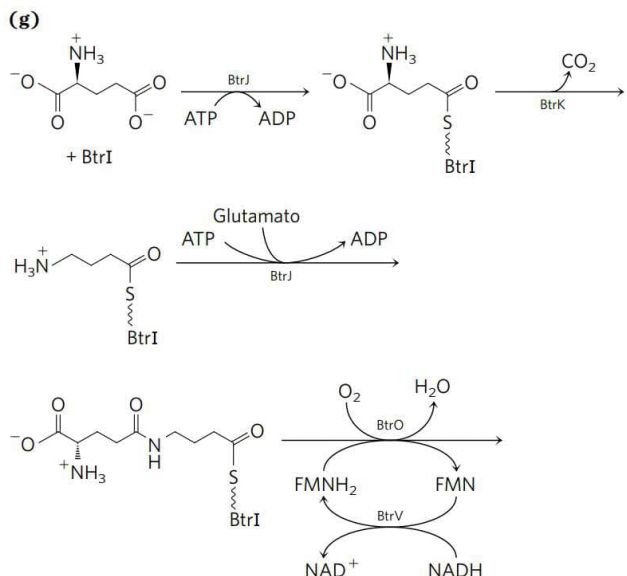
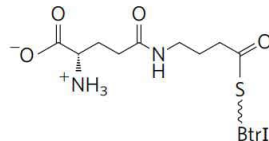
16. O tratamento com alopurinol tem duas consequências. (1) Inibe a conversão de hipoxantina em ácido úrico, causando acúmulo de hipoxantina, a qual é mais solúvel e mais facilmente excretada; isso alivia os problemas clínicos associados à degradação de AMP. (2) Inibe a conversão de guanina em ácido úrico, causando acúmulo de xantina, a qual é menos solúvel do que ácido úrico; essa é a fonte de cálculos de xantina. Como a quantidade de degradação de GMP é baixa em relação à degradação de AMP, os danos nos rins causados pelos cálculos de xantina são menores que os danos causados pela gota não tratada.

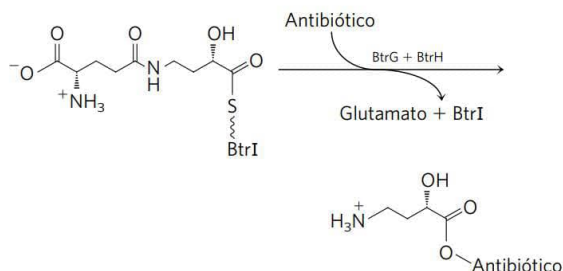
17. 5-Fosforibosil-1-pirofosfato; esse é o primeiro aceptor de NH_3 na via biossintética de purinas.

18. (a) O grupo α -carboxila é removido e uma $-\text{OH}$ é adicionada ao carbono γ . (b) BtrI tem homologia de sequência com proteínas carreadoras de acilas. O peso molecular de BtrI aumenta quando incubado sob condições nas quais a CoA possa ser adicionada à proteína. Adicionar CoA ao resíduo de Ser deslocaria uma $-\text{OH}$, peso molecular (PM) 17, com um grupo 4'-fosfopantetina (ver Figura 21-5; fórmula $\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_7\text{PS}$), PM 356. Dessa forma, $11.182 - 17 + 356 = 12.151$, o qual é muito próximo ao M_r observado de 12.153. (c) O tioéster poderia se formar com o grupo α -carboxila. (d) Na reação mais comum de remoção do grupo α -carboxila de um aminoácido (ver Figura 18-6, reação 9), o grupo carboxila deve estar livre. Além disso, é difícil imaginar uma reação de descarboxilação que comece com o grupo carboxila na sua forma tioéster. (e) $12.240 - 12.281 = 41$, próximo do M_r do CO_2 (44). Considerando que BtrK é provavelmente uma descarboxilase, a estrutura mais provável seria a forma descarboxilada:



(f) $12.370 - 12.240 = 130$. Ácido glutâmico ($\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$; M_r 147), menos o $-\text{OH}$ (PM 17) removido na reação de glutamilação, deixa um grupo glutamil de PM 130; então, adicionando esse grupo por uma reação de γ -glutamilação à molécula mostrada acima, seria adicionada 130 à sua M_r . BtrJ é capaz de fazer γ -glutamilação de outros substratos, então pode fazer o mesmo com a molécula acima. O sítio mais provável para isso é o grupo amina livre, gerando a seguinte estrutura:





Capítulo 23

1. Eles são reconhecidos por dois receptores diferentes, normalmente encontrados em diferentes tipos de células e estão acoplados a diferentes efeitos a jusante.

2. Os níveis de ATP no estado estacionário são mantidos pela transferência do grupo fosforila para o ADP a partir da fosfocreatina. 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzeno inibe a creatina-quinase.

3. A amônia é altamente tóxica para o tecido nervoso, principalmente o cérebro. Em indivíduos saudáveis, o excesso de NH_3 é removido pela transformação do glutamato em glutamina, que chega até o fígado e é, posteriormente, transformada em ureia. A glutamina adicional surge da conversão de glicose em α -cetoglutarato, transaminação de α -cetoglutarato em glutamato e conversão de glutamato em glutamina.

4. Os aminoácidos glicogênicos são usados para produzir glicose para o cérebro; os outros são desaminados e depois oxidados nas mitocôndrias através do ciclo do ácido cítrico.

5. De glicose, pela seguinte rota: Glicose \rightarrow di-hidroxiacetona-fosfato (na glicólise); di-hidroxiacetona-fosfato + $\text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow$ glicerol-3-fosfato + NAD^+ (reação da glicerol-3-fosfato-desidrogenase).

6. (a) O aumento da atividade muscular aumenta a demanda por ATP, que é atendida pelo aumento do consumo de O_2 . (b) Após a corrida de curta distância, o lactato produzido pela glicólise anaeróbica é convertido em glicose e glicogênio, o que requer ATP e, portanto, O_2 .

7. A glicose é o principal combustível para o cérebro. A descarboxilação oxidativa dependente de TPP do piruvato para acetil-CoA é essencial para completar o metabolismo da glicose.

8. 190 m

9. (a) A inativação fornece um meio rápido para alterar a concentração do hormônio ativo. (b) O nível de insulina é mantido por taxas iguais de síntese e degradação. (c) Mudanças na taxa de liberação dos estoques, na velocidade do transporte e na taxa de conversão do pró-hormônio em hormônio ativo.

10. Os hormônios hidrossolúveis ligam-se a receptores na superfície externa da célula, desencadeando a formação de um segundo mensageiro (p. ex., cAMP) dentro da célula. Os hormônios lipossolúveis podem atravessar a membrana plasmática para atuar diretamente sobre moléculas-alvo ou receptores.

11. (a) Coração e músculo esquelético não tem glicose-6-fosfatase. Qualquer glicose-6-fosfato produzida entra na via glicolítica e, na falta de O_2 , é convertida em lactato via piruvato. (b) Em uma situação de “luta ou fuga”, a concentração de precursores glicolíticos deve ser alta em preparação para a atividade muscular. Os intermediários fosforilados não podem escapar da célula, uma vez que a membrana não é permeável a espécies carregadas, e a glicose-6-fosfato não é exportada pelo transportador de glicose. O fígado, por outro lado, deve liberar a glicose necessária para manter os níveis de glicose no sangue; a glicose é formada a partir da glicose-6-fosfato e entra na corrente sanguínea.

12. (a) A absorção excessiva e o uso de glicose no sangue pelo fígado, levando à hipoglicemia; paralisação do catabolismo de aminoácidos e ácidos graxos. (b) Há pouca disponibilidade de combustível circulante para as necessidades de ATP. Os danos cerebrais ocorrem porque a glicose é a principal fonte de combustível para o cérebro.

13. A tiroxina age como um desacoplador da fosforilação oxidativa. Os desacopladores diminuem a relação P/O, e o tecido deve aumentar a respiração para atender às demandas normais de ATP. A termogênese também pode ser devida ao aumento da taxa de uso de ATP pelo tecido estimulado pela tireoide, uma vez que o aumento das demandas de ATP é alcançado pelo aumento da fosforilação oxidativa e, portanto, pelo aumento da respiração.

14. Como os pró-hormônios são inativos, eles podem ser armazenados em grandes quantidades em grânulos de secreção. A ativação rápida é obtida por clivagem enzimática em resposta a um sinal apropriado.

15. Em animais, a glicose pode ser sintetizada a partir de muitos precursores (ver Figura 14-16). Nos seres humanos, os principais precursores são o glicerol dos TAG e os aminoácidos glicogênicos das proteínas.

16. O camundongo *ob/ob*, inicialmente obeso, perderá peso. O camundongo *OB/OB* manterá seu peso normal.

17. $\text{IMC} = 39,3$. Para um IMC de 25, o peso deve ser de 75 kg; ele deve perder 43 kg.

18. Secreção de insulina reduzida. A valinomicina tem o mesmo efeito que a abertura do canal de K^+ , permitindo a saída do íon e a hiperpolarização.

19. O fígado não recebe a mensagem de insulina e, portanto, continua a manter níveis altos de glicose-6-fosfatase e gliconeogênese, aumentando a glicemia tanto durante o jejum quanto após uma refeição contendo glicose. A glicose sanguínea elevada desencadeia a liberação de insulina pelas células β -pancreáticas, daí os níveis elevados de insulina no sangue.

20. Alguns pontos a considerar: qual é a frequência de infarto do miocárdio atribuído ao fármaco entre seus usuários? Como essa frequência se compara com os dados sobre indivíduos poupados das consequências a longo prazo da diabetes tipo 2? Existem outras opções de tratamento igualmente eficazes com menos efeitos adversos?

21. Sem a atividade da glicosidase intestinal, a absorção de glicose do glicogênio e do amido da dieta está reduzida, atenuando o aumento usual da glicose no sangue após uma refeição. Os oligossacarídeos não digeridos são fermentados por bactérias intestinais, e os gases liberados causam desconforto intestinal.

22. (a) Aumentado; o fechamento do canal de K^+ dependente de ATP despolarizaria a membrana, aumentando a liberação de insulina. (b) O diabetes tipo 2 resulta da diminuição da sensibilidade à insulina, não de um déficit na produção de insulina; o aumento dos níveis circulantes de insulina reduzirá os sintomas associados a essa doença. (c) Indivíduos com diabetes tipo 1 têm células β -pancreáticas deficientes, portanto a gliburida não terá efeito benéfico. (d) O iodo, como o cloro (o átomo que ele substitui na gliburida marcada), é um halogênio, mas é um átomo maior e possui propriedades químicas ligeiramente diferentes. A gliburida iodada pode não se ligar ao SUR. Se ela se ligasse a outra molécula, a experiência resultaria na clonagem do gene para essa outra proteína incorreta. (e) Embora uma proteína tenha sido “purificada”, a preparação “purificada” pode ser uma mistura de várias proteínas que copurificam sob essas condições experimentais. Neste caso, a sequência de aminoácidos pode ser a de uma proteína que copurifica com SUR. A utilização da ligação de anticorpos para mostrar que as sequências peptídicas estão presentes em SUR exclui essa possibilidade. (f) Embora o gene clonado codifique a sequência de 25 aminoácidos encontrada em SUR, pode ser um gene que, por coincidência, codifica a mesma sequência em outra proteína. Neste caso, o outro gene seria muito provavelmente expresso em células diferentes do gene SUR. Os resultados da hibridização do mRNA são consistentes com o suposto cDNA do gene SUR que codifica a proteína SUR. (g) O excesso de gliburida não marcada compete com a gliburida marcada pelo sítio de ligação em SUR. Como resultado, há significativamente menos ligação da gliburida marcada; portanto, pouca ou nenhuma radioatividade é detectada na proteína de 140 kDa. (h) Na ausência de excesso de gliburida não marcada, a proteína de 140 kDa marcada é encontrada apenas na presença do suposto cDNA do SUR. O excesso de gliburida não marcada compete com a gliburida marcada e não é detectada nenhuma proteína de 140 kDa marcada com ^{125}I . Isso demonstra que o cDNA produz uma

proteína que se liga à gliburida de mesmo peso molecular que a proteína SUR – evidência forte de que o gene clonado codifica a proteína SUR.

(i) Várias etapas adicionais são possíveis, como: (1) expressar o putativo cDNA da SUR em células de CHO (do inglês, *chinese hamster ovary*) e mostrar que as células transformadas apresentam atividade de canal de K^+ dependente de ATP. (2) Mostrar que as células HIT com mutações no putativo gene SUR não apresentam atividade de canal de K^+ dependente de ATP. (3) Mostrar que seres humanos ou animais experimentais com mutações no putativo gene SUR não secretam insulina.

Capítulo 24

1. 6.1×10^4 nm; 290 vezes maior que a cabeça do fago T2

2. Como o número de resíduos de A não é igual ao número de resíduos de T e o número de resíduos de G não é igual ao número de resíduos de C, esse DNA não é uma dupla-hélice com hélices pareadas. O DNA do M13 é de cadeia única.

3. $M_r = 3,8 \cdot 10^6$; comprimento = $200 \mu\text{m}$; $Lk_0 = 55.200$; $Lk = 51.900$.

4. Os éxons contêm $3 \text{ pb/aminoácido} \times 192 \text{ aminoácidos} = 576 \text{ pb}$. Os restantes 864 pb são íntrons, possivelmente em uma sequência-líder ou de sinal e/ou outro DNA não codificador.

5. 5.000 pb. **(a)** Não se altera; o Lk não se altera a menos que haja quebra e reformação do esqueleto do DNA. **(b)** Torna-se indefinido; um DNA circular com quebra em uma das cadeias, por definição, não tem Lk . **(c)** Diminui: na presença de ATP, a girase desenrola o DNA. **(d)** Não se altera; supondo que nenhuma das duas cadeias do DNA se quebre no processo de aquecimento.

6. Para que o Lk se mantenha inalterado, a topoisomerase deve introduzir o mesmo número de supertorções positivas e de supertorções negativas.

7. $\sigma = -0,067$; probabilidade maior que 70%.

8. **(a)** Indefinido; as cadeias de um DNA quebrado podem ser separadas e, assim, elas não possuem Lk . **(b)** 476. **(c)** O DNA já está relaxado e, então, a topoisomerase não pode provocar uma mudança efetiva; $Lk = 476$. **(d)** 460; a girase mais o ATP reduz o Lk em incrementos de 2. **(e)** 464; em eucariotos, topoisomerases tipo I aumentam o Lk do DNA, desenrolado ou supertorcido negativamente, em incrementos de 1. **(f)** 460; a associação em nucleossomos não quebra nenhuma das cadeias do DNA e, assim, não modifica o Lk .

9. A unidade fundamental estrutural da cromatina se repete a cada 200 pb; o DNA está acessível à nuclease apenas em intervalos de 200 pb. O tratamento brando não é suficiente para clivar o DNA nos pontos acessíveis e, assim, uma sequência de bandas de DNA é formada, sendo que os fragmentos de DNA têm um tamanho múltiplo de 200 pb. As espessuras das bandas de DNA sugerem que as distâncias entre os sítios de clivagem variam um pouco. Por exemplo, nem todos os fragmentos da banda menor têm exatamente 200 pb.

10. Uma hélice voltada para a direita tem o Lk positivo e uma hélice voltada para a esquerda (como o Z-DNA) tem o Lk negativo. Diminuindo o Lk de um DNA-B circular por desenrolamento, facilita a formação de regiões de DNA-Z dentro de certas sequências. (Ver Capítulo 8, p. 289, para uma descrição das sequências que permitem a formação de DNA-Z.)

11. **(a)** Ambas as cadeias devem estar fechadas covalentemente e a molécula deve ser circular, ou então forçada em ambas as extremidades. **(b)** Favorecimento da formação de cruciformes, DNA-Z voltado para a esquerda, supertorção plectonômica ou solenoidal e desenrolamento do DNA. **(c)** DNA-topoisomerase II ou DNA-girase de *E. coli*. **(d)** Ela liga o DNA em um ponto onde ele se cruza, corta os dois filamentos de um dos segmentos cruzados, passa o outro segmento pela quebra e, em seguida, fecha novamente o ponto de quebra. O resultado é uma alteração no Lk de -2.

12. Centrômero, telômeros e uma sequência autônoma de replicação ou origem de replicação.

13. O nucleóide bacteriano está organizado em domínios com tamanho aproximado de 10.000 pb. A clivagem por enzimas de restrição relaxa

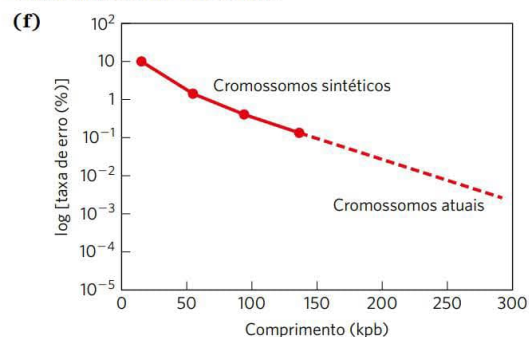
o DNA dentro do domínio, mas não fora dele. Qualquer gene presente no domínio clivado e cuja expressão seja afetada pela topologia do DNA será afetado pela clivagem; os genes fora do domínio não serão afetados.

14. **(a)** A banda inferior, de migração mais rápida, corresponde ao DNA plasmidial supertorcido negativamente. A banda superior corresponde ao DNA cortado, relaxado. **(b)** A DNA-topoisomerase I relaxaria o DNA supertorcido. A banda inferior desaparece, e todo o DNA se localiza na banda superior. **(c)** A DNA-ligase produz pequenas mudanças no padrão. Algumas bandas adicionais minoritárias podem aparecer próximo à banda superior, devido ao aprisionamento de topoisomerases não totalmente relaxadas pela reação de ligação. **(d)** A banda superior desaparece, e todo o DNA estaria na banda inferior. O DNA supertorcido na banda inferior pode se tornar ainda mais torcido e migrar um pouco mais rápido.

15. **(a)** Quando as extremidades dos DNA são seladas, para criar um círculo fechado relaxado, algumas espécies de DNA ficam completamente relaxadas, mas outras estão fechadas em estados levemente desenrolados ou superenrolados. Isso origina uma distribuição de topômeros centrada nas espécies mais relaxadas. **(b)** Supertorcido positivamente. **(c)** O DNA é relaxado mesmo que a adição de corante ocorra no DNA com quebra em uma ou nas duas cadeias. Inevitavelmente, os procedimentos de isolamento de DNA introduzem um pequeno número de quebras nas cadeias de moléculas circulares. **(d)** -0,05. Isso é determinado pela simples comparação do DNA nativo com amostras de σ conhecido. Em ambos os géis, o DNA nativo migra para mais perto de amostras com $\sigma = -0,049$.

16. Sessenta e dois milhões (o genoma refere-se ao conteúdo genético haploide da célula; na verdade a célula é diploide, de forma que o número de nucleossomos está duplicado). O número é obtido dividindo-se 3,1 bilhões de pares de bases dividido por 200 pb/nucleossomo (dando 15,5 milhões de nucleossomos), multiplicado por duas cópias de H2A por nucleossomo e multiplicado de novo por 2 para levar em conta o estado diploide da célula. Os 62 milhões podem dobrar na replicação.

17. **(a)** Na não disjunção, uma das células-filhas e todas as suas descendentes pegam duas cópias do cromossomo sintético e são brancas; a outra célula-filha e todas as suas descendentes não pegam cópia do cromossomo sintético e são vermelhas. Isso origina uma colônia metade branca e metade vermelha. **(b)** Na perda dos cromossomos, uma das células-filhas e todas as suas descendentes pegam uma cópia do cromossomo sintético e são rosadas; a outra célula-filha e todas as suas descendentes não pegam cópias do cromossomo sintético e são vermelhas. Isso origina uma colônia metade rosada e metade vermelha. **(c)** O tamanho mínimo de um centrômero funcional deve ser menor que 0,63 kpb, uma vez que todos os fragmentos desse tamanho ou de tamanho maiores conferem uma relativa estabilidade mitótica. **(d)** Há necessidade de telômeros para a replicação completa apenas de DNA linear; uma molécula circular pode replicar sem telômeros. **(e)** Quanto maior for o cromossomo, maior a fidelidade de segregação. Os resultados não mostram o tamanho mínimo abaixo do qual um cromossomo sintético é completamente instável e nem o tamanho máximo acima do qual a estabilidade não se altera mais.



Como mostrado no gráfico, mesmo se os cromossomos sintéticos fossem tão longos como os cromossomos normais de levedura, eles não seriam tão estáveis. Isso sugere que outros elementos, ainda desconhecidos, são necessários para a estabilidade.

Capítulo 25

1. Em replicação dispersiva aleatória, na segunda geração, todos os DNAs teriam a mesma densidade e apareceriam como uma única banda, não as duas bandas observadas no experimento de Meselson-Stahl.

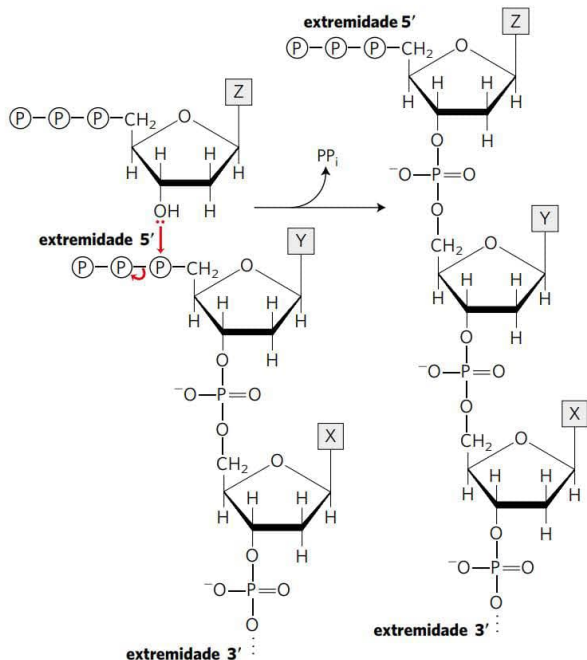
2. Nesta extensão do experimento de Meselson-Stahl, após três gerações, a razão molar de ^{15}N - ^{14}N DNA para ^{14}N - ^{14}N DNA é de $2/6 = 0,33$.

3. (a) $4,42 \times 10^5$ voltas. (b) 40 min. Nas células em que se dividem a cada 20 min, um ciclo replicativo é iniciado a cada 20 min, cada ciclo começando antes da finalização do ciclo anterior. (c) Dois mil a 5.000 fragmentos de Okazaki. Os fragmentos têm de 1.000 a 2.000 nucleotídeos e estão firmemente ligados à cadeia-molde pelo pareamento de bases. Cada fragmento é rapidamente unido à fita tardia, preservando, assim, a ordem correta dos fragmentos.

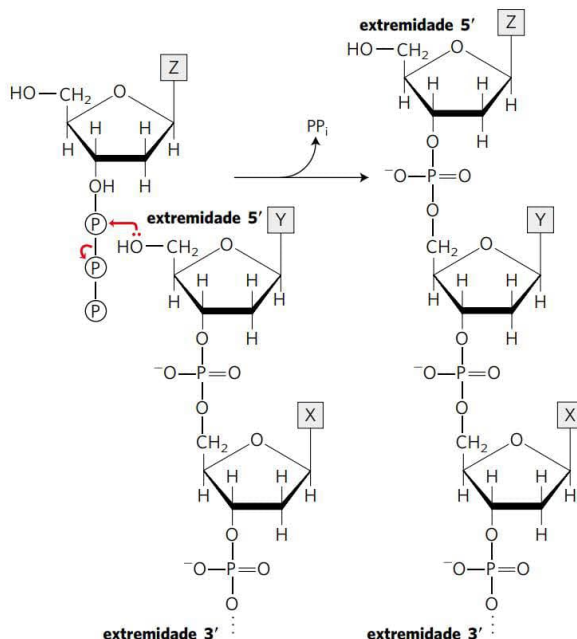
4. A, 28,7%; G, 21,3%; C, 21,3%; T, 28,7%. A fita de DNA produzida a partir da fita-molde: A, 32,7%; G, 18,5%; C, 24,1%; T, 24,7%; a fita de DNA produzida a partir da fita complementar: A, 24,7%; G, 24,1%; C, 18,5%; T, 32,7%. Isso pressupõe que as duas fitas-molde são replicadas completamente.

5. (a) Não. A incorporação de ^{32}P no DNA resulta da síntese de novo DNA, que requer a presença de todos os quatro precursores dos nucleotídeos. (b) Sim. Embora todos os quatro precursores dos nucleotídeos devam estar presentes para a síntese de DNA, apenas um deles deve ser radioativo para que a radioatividade apareça no novo DNA. (c) Não. A radioatividade só é incorporada se a marcação ^{32}P estiver no fosfato α ; a DNA-polimerase cliva o pirofosfato, isto é, os grupos fosfato β e γ .

6. **Mecanismo 1:** o grupo 3'-OH de um dNTP que está entrando ataca o fosfato α do trifosfato na extremidade 5' da fita de DNA em crescimento, deslocando o pirofosfato. Esse mecanismo usa dNTP normais, e a extremidade crescente do DNA sempre tem um trifosfato na extremidade 5'.



Mecanismo 2: esse usa um novo tipo de precursor, o nucleotídeo 3'-trifosfato. A extremidade em crescimento da fita de DNA possui um grupo 5'-OH, que ataca o fosfato α de um desoxinucleosídeo-3'-trifosfato que está entrando, deslocando o pirofosfato. Observe que esse mecanismo exigiria a evolução de novas vias metabólicas para fornecer os desoxinucleosídeos-3'-trifosfosatos necessários.



7. A DNA-polimerase contém uma atividade de exonuclease 3'→5' que degrada o DNA para produzir [^{32}P]dNMP. A atividade não é uma exonuclease 5'→3', uma vez que a adição de dNTP não marcados inibe a produção de [^{32}P]dNMP (a atividade de polimerização suprimiria uma exonuclease de revisão, mas não uma exonuclease atuando a jusante da polimerase). A adição de pirofosfato geraria [^{32}P]dNTP pela reversão da reação da polimerase.

8. **Fita contínua:** precursores: dATP, dGTP, dCTP, dTTP (também necessita de um fita-molde de DNA e de um iniciador de DNA); enzimas e outras proteínas: DNA-girase, helicase, proteína de ligação a DNA de fita simples, DNA-polimerase III, topoisomerases e pirofosfatase. **Fita tardia:** precursores: ATP, GTP, CTP, UTP, dATP, dGTP, dCTP, dTTP (também precisa de um iniciador de RNA); enzimas e outras proteínas: DNA-girase, helicase, proteína de ligação a DNA de fita simples, primase, DNA-polimerase III, DNA-polimerase I, DNA-ligase, topoisomerases e pirofosfatase. NAD^+ é também necessário como cofator para a DNA-ligase.

9. Mutantes com DNA-ligase defeituosa produzem um dúplex de DNA, no qual um dos filamentos permanece em pedaços (como fragmentos de Okazaki). Quando esse dúplex é desnaturado, a sedimentação resulta em uma fração contendo a fita simples intacta (a banda de alto peso molecular) e uma fração contendo os fragmentos não processados (a banda de baixo peso molecular).

10. Pareamento de bases de Watson-Crick entre a cadeia-molde e cadeia principal; revisão e remoção de nucleotídeos inseridos erroneamente pela atividade de 3'-exonuclease da DNA-polimerase III. Sim, talvez. Porque os fatores que garantem a fidelidade da replicação operam tanto na fita-líder quanto na fita tardia, a fita tardia provavelmente seria feita com a mesma fidelidade. No entanto, o maior número de operações químicas distintas envolvidas na produção da fita tardia pode fornecer uma oportunidade maior para que surjam erros.

11. Aproximadamente 1.200 pb (600 em cada direção).

12. Uma pequena fração (13 das 10^9 células) dos mutantes que requerem histidina sofre reversão da mutação espontaneamente e recupera a sua capacidade de sintetizar histidina. O 2-aminoantraceno aumenta a taxa de reversão de mutações em cerca de 1.800 vezes e, portanto, é mutagênico. Como a maioria dos carcinogênicos é mutagênica, o 2-aminoantraceno é provavelmente carcinogênico.

13. A desaminação espontânea da 5-metilcitosina (Figura 8-29a) produz timina e, portanto, um malpareamento com G-T. Esses estão entre os malpareamentos mais comuns no DNA dos eucariotos. O sistema de reparo especializado restaura o par G=C.

14. Aproximadamente 1.950 (650 no DNA degradado entre o malpareamento e GATC, mais 650 na síntese de DNA para preencher a lacuna resultante, mais 650 na degradação dos produtos pirofosfato para fosfato inorgânico). O ATP é hidrolisado pelo complexo MutL-MutS e pela helicase UvrD.

15. (a) A irradiação UV produz dímeros de pirimidina; em fibroblastos normais, estes são removidos por clivagem da cadeia danificada por uma excinuclease específica. Assim, o DNA de fita simples desnaturado contém os muitos fragmentos criados pela clivagem, e o peso molecular médio é menor. Estes fragmentos de DNA de cadeia simples estão ausentes das amostras de XPG, como indicado pelo peso molecular médio inalterado. **(b)** A ausência de fragmentos no DNA de fita simples das células XPG após a irradiação sugere que a excinuclease específica está com defeito ou ausente.

16. Usando G* para representar O^6 -meG:

(a) (5')AACG*TCAC
TTG T ACGTG

(5')AACGTGCAC
TTGCACGTG

(b) (5')AACGTGCAC
TTGCACGTG

(5')AACGTGCAC
TTGCACGTG

(c) (5')AACG*TCAC
TTG T ACGTG

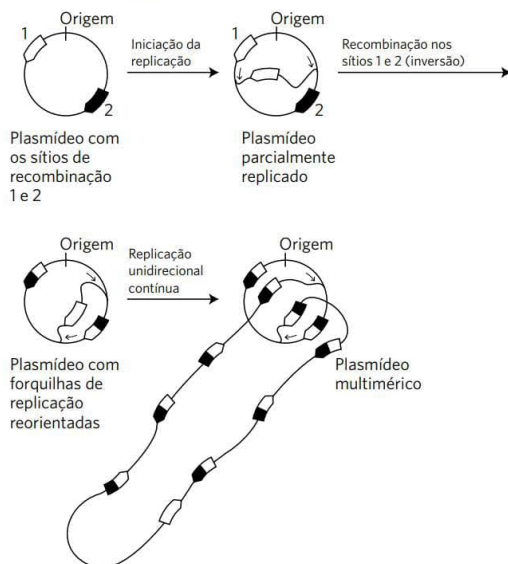
(5')AACATGCAC
TTGTACGTG

2× (5')AACGTGCAC
TTGCACGTG

17. Durante a recombinação genética homóloga, um intermediário de Holliday pode ser formado em quase qualquer lugar dentro dos dois cromossomos homólogos pareados; o ponto de ramificação do intermediário pode se mover extensivamente pela migração de ramificação. Na recombinação sítio-específica, o intermediário de Holliday forma-se entre dois sítios específicos, e a migração da ramificação é geralmente restrita a sequências heterólogas em ambos os lados dos sítios de recombinação.

18. (a) Pontos Y. **(b)** Pontos X.

19. Uma vez que a replicação tenha prosseguido da origem até um ponto onde um sítio de recombinação foi replicado, mas o outro não, a recombinação sítio-específica não apenas inverte o DNA entre os sítios de recombinação, mas altera também a direção de uma forquilha de replicação em relação à outra. As forquilhas vão de encontro uma à outra ao redor do círculo de DNA, gerando muitas cópias do plasmídeo. O círculo multimérico pode ser dividido em monômeros por eventos adicionais de recombinação sítio-específica.



20. (a) Mesmo na ausência de um mutagênico adicional, ocorrem mutações basais devido à radiação, a reações químicas celulares, e assim por diante. **(b)** Se o DNA estiver suficientemente danificado, uma fração substancial de produtos gênicos não é funcional, e a célula é inviável. **(c)** Células com capacidade reduzida de reparo do DNA são mais sensíveis a agentes mutagênicos. Como as bactérias Uvr^- reparam as lesões causadas pelo R7000 de maneira menos eficiente, elas têm uma taxa de mutação aumentada e maior chance de efeitos letais. **(d)** Na linhagem Uvr^+ , o sistema de reparação de excisão remove as bases de DNA ligadas ao [3H]R7000, diminuindo a quantidade de 3H nessas células ao longo do tempo. Na linhagem Uvr^- , o DNA não é reparado, e o nível de 3H aumenta à medida que o [3H]R7000 continua reagindo com o DNA. **(e)** Todas as mutações listadas na tabela, exceto A=T para G=C, mostram aumentos significativos em relação ao basal. Cada tipo de mutação é o resultado de um tipo diferente de interação entre o R7000 e o DNA. Como tipos diferentes de interações não são igualmente prováveis (devido a diferenças de reatividade, restrições estéricas, etc.), as mutações resultantes ocorrem com frequências diferentes. **(f)** Não. Somente aqueles que iniciam com o par de bases G=C são explicados por esse modelo. Assim, A=T para C=G e A=T para T=A devem ser devido à ligação do R7000 a uma A ou uma T. **(g)** R7000-G pareia com A. Primeiro, o R7000 acopla-se a G=C, gerando R7000-G=C. (Compare com o que ocorre com o CH_3 -G na Figura 25-27b.) Se isso não for reparado, uma fita é replicada como R7000-G=A, a qual é reparada para T=A. A outra fita é a selvagem. Se a replicação produz R7000-G=T, uma via semelhante leva a um par de base A=T. **(h)** Não. Compare os dados nas duas tabelas e tenha em mente que diferentes mutações ocorrem com frequências diferentes.

A=T para C=G: moderada em ambas as fitas; mas mais bem reparada na linhagem Uvr^+

G=C para A=T: moderada em ambas; sem diferença real

G=C para C=G: maior em Uvr^+ ; certamente menos reparo

G=C para T=A: alta em ambas; sem diferença real

A=T para T=A: alta em ambas; sem diferença real

A=T para G=C: baixa em ambas; sem diferença real

Determinados adutos podem ser reconhecidos mais facilmente do que outros pela maquinaria de reparo, sendo reparados mais rapidamente e originando menos mutações.

Capítulo 26

1. (a) 60 a 100 s. **(b)** 500 a 900 nucleotídeos.

2. Um erro de base única na replicação do DNA, se não corrigido, faria uma das duas células-filhas, e toda a sua progênie, ter um cromossomo mutado. Um erro de base única na transcrição de RNA não afetaria o cromossomo; isso levaria à formação de algumas cópias defeituosas de uma proteína, porém, como os mRNA se transformam rapidamente, a maioria das cópias da proteína não seria defeituosa. A progênie dessa célula seria normal.

3. O processamento pós-transcricional normal na extremidade 3' (clivagem e poliadenilação) seria inibido ou bloqueado.

4. Uma vez que o RNA fita-molde não codifica as enzimas necessárias para o início da infecção viral, ele provavelmente seria inerte ou simplesmente degradado pelas ribonucleases celulares. A replicação do RNA de fita-molde e a propagação do vírus poderia ocorrer apenas se a RNA-replicase intacta (RNA-polimerase dependente de RNA) fosse introduzida na célula juntamente com a fita-molde.

5. AUGACCAUGAUUACG

6. (1) Uso de uma fita-molde de ácidos nucleicos; (2) síntese no sentido 5'→3'; (3) uso de substratos nucleosídeos-trifosfato, com formação de uma ligação fosfodiéster e deslocamento de PP_i . A polinucleotídeo-fosforilase forma ligações fosfodiéster, mas difere em todas as outras propriedades listadas.

7. Geralmente duas: uma para clivar a ligação fosfodiéster em uma junção íntron-éxon; a outra para ligar a extremidade do éxon livre resultante com o éxon na outra extremidade do íntron. Se o nucleófilo na primeira etapa fosse água, essa etapa seria uma hidrólise, e apenas uma etapa de trans-terificação seria necessária para completar o processo de *splicing*.

8. Muitos snoRNA, necessários para as reações de modificação de rRNA, são codificados em introns. Se não ocorrer o *splicing*, os snoRNA não são produzidos.

9. Essas enzimas não têm atividade exonucleásica de revisão 3'→5' e têm alta taxa de erro; a probabilidade de um erro na replicação que inative o vírus é muito menor em genomas pequenos do que em grandes.

10. (a) $4^{32} = 1,8 \times 10^{19}$. (b) 0,006%. (c) Para a etapa de "seleção não natural", usar resina cromatográfica com uma molécula ligada que é um análogo do estado de transição do éster da reação de hidrólise.

11. Embora a síntese de RNA seja rapidamente interrompida pela toxina α -amanitina, leva vários dias para que os mRNA e as proteínas no fígado se degradem, causando disfunção hepática e morte.

12. (a) Após a lise das células e a purificação parcial do conteúdo, o extrato proteico pode ser submetido à focalização isoeletrica. A subunidade β pode ser detectada por um ensaio baseado em anticorpos. A diferença nos resíduos de aminoácidos entre a subunidade β normal e

a forma mutada (i.e., as diferentes cargas nos aminoácidos) alteraria a mobilidade eletroforética da proteína mutante em um gel de focalização isoeletrica, em relação àquela da proteína da linhagem não resistente. (b) Sequenciamento direto de DNA (pelo método de Sanger).

13. (a) 384. (b) 1.620 pares de nucleotídeos. (c) A maioria dos nucleotídeos estão nas regiões não traduzidas nas extremidades 3' e 5' do mRNA. Além disso, a maioria dos mRNA codifica para uma sequência-sinal (Capítulo 27) nos seus produtos proteicos, que é, eventualmente, removida para produzir a proteína funcional madura.

14. (a) O cDNA é produzido por transcrição reversa do mRNA; assim, a sequência de mRNA é provavelmente CGG. Uma vez que o DNA genômico transcrito para fazer o mRNA tem a sequência CAG, o transcrito primário provavelmente também tem CAG, que é pós-transcricionalmente modificado para CGG. (b) A sequência de mRNA não editada é a mesma que a do DNA (exceto pela substituição de U por T). O mRNA não editado possui a seguinte sequência (* indica o sítio de edição):

(5') --- GUCUCUGGUUUUCCUUGGGUGCCUUUAUGCAGCAAGGAUGCGAUUUUCGCCAAG --- (3')

Na etapa 1, o iniciador 1 parecia conforme mostrado:

(5') --- GUCUCUGGUUUUCCUUGGGUGCCUUUAUGCAGCAAGGAUGCGAUUUUCGCCAAG --- (3')

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Primer 1: (3')CGTTTCCTACGCTATAAAGCGGTTC (5')

o cDNA (sublinhado) é sintetizado da direita para a esquerda:

(5') --- GUCUCUGGUUUUCCUUGGGUGCCUUUAUGCAGCAAGGAUGCGAUUUUCGCCAAG --- (3')

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

(3') --- CAGAGACCAAAAGGAACCCACGGAATACGTCTCGTTTCCTACGCTATAAAGCGGTTC (5')

Então, a etapa 2 produz apenas o cDNA:

(3') --- CAGAGACCAAAAGGAACCCACGGAATACGTCTCGTTTCCTACGCTATAAAGCGGTTC (5')

Na etapa 3, o iniciador 2 parecia com o cDNA:

Primer 2: (5')CCTTGGGTGCCTTTA(3')

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

(3') --- CAGAGACCAAAAGGAACCCACGGAATACGTCTCGTTTCCTACGCTATAAAGCGGTTC (5')

A DNA-polimerase adiciona nucleotídeos à extremidade 3' deste iniciador. Movendo-se da esquerda para a direita, ela insere T, G, C e A. No entanto, como o A de ddATP não possui o grupo 3'OH necessário para se ligar ao próximo nucleotídeo, a cadeia não é alongada além desse ponto. Essa base A é mostrada em itálico; o novo DNA está sublinhado:

Primer 2: (5')CCTTGGGTGCCTTTATGCA

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

(3') --- CAGAGACCAAAAGGAACCCACGGAATACGTCTCGTTTCCTACGCTATAAAGCGGTTC (5')

Isso gera um fragmento de 19 nucleotídeos para o transcrito não editado. No transcrito editado, o * A é trocada por G; no cDNA, corresponde a C. No início da etapa 3:

Primer 2: (5')CCTTGGGTGCCTTTA(3')

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

(3') --- CAGAGACCAAAAGGAACCCACGGAATACGCGTTTCCTACGCTATAAAGCGGTTC (5')

Nesse caso, a DNA-polimerase pode se alongar além da base editada e parará no próximo T no cDNA. A base didesóxi A está em itálico; o novo DNA está sublinhado:

Primer 2: (5')CCTTGGGTGCCTTTATGCGGCA

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

(3') --- CAGAGACCAAAAGGAACCCACGGAATACGCGTTTCCTACGCTATAAAGCGGTTC (5')

Isso gera o produto de 22 nucleotídeos. (c) Os tratamentos (proteases, calor) conhecidos por perturbar a função proteica inibem a atividade de edição, ao passo que os tratamentos (nuclease) que não afetam as proteínas têm pouco ou nenhum efeito na edição. Uma fragilidade-chave desse argumento é que os tratamentos que destroem as proteínas não excluem completamente a edição. Pode haver alguma edição de fundo ou degradação do mRNA mesmo sem a enzima, ou alguma enzima pode sobreviver aos tratamentos. (d) Somente o fosfato α dos NTP é incorporado aos polinucleotídeos. Se os pesquisadores tivessem usado os outros tipos de [32 P]NTP, nenhum dos produtos teria sido marcado.

(e) Uma vez que apenas A está sendo editado, somente o destino de qualquer A na sequência é de interesse. (f) Dado que somente o ATP foi marcado, se o nucleotídeo inteiro fosse removido, toda a radioatividade teria sido removida do mRNA, então somente o [32 P]AMP não modificado estaria presente na placa cromatográfica. (g) Se a base fosse removida e substituída, seria esperado ver apenas [3 H]AMP. A presença de [3 H]IMP indica que a mudança de A para I ocorre sem a remoção de H nas posições 2 e 8. O mecanismo mais provável é a modificação química de A para I pela desaminação hidrolítica (ver Figura 22-36). (h) CAG é trocado por CIG. Este códon é lido como CGG.

Capítulo 27

1. **(a)** Gly–Gln–Ser–Leu–Leu–Ile. **(b)** Leu–Asp–Ala–Pro. **(c)** His–Asp–Ala–Cys–Cys–Tyr. **(d)** Met–Asp–Glu nos eucariotos; fMet–Asp–Glu em bactérias.

2. UUAUGUAU, UUGAUGUAU, CUUAUGUAU, CUCAUGUAU, CUAUGUAU, CUGAUGUAU, UUAAGUAU, UUGAUGUAC, CUUAUGUAC, CUCAUGUAC, CUAAGUAC, CUGAUGUAC

3. Não. Uma vez que praticamente todos os aminoácidos têm mais do que um códon (p. ex., Leu tem seis), qualquer que seja o polipeptídeo, ele pode ser codificado por várias sequências diferentes de bases. Entretanto, alguns aminoácidos são codificados por apenas um códon, e os aminoácidos com mais de um códon têm códons que possuem um mesmo nucleotídeo em duas das três posições, então *certas partes* da sequência de mRNA que codifica para uma proteína cuja sequência de aminoácidos seja conhecida podem ser preditas com alto grau de certeza.

4. **(a)** (5')CGACGGCGCGAAGUCAGGGGUGUUAAG(3'). **(b)** Arg–Arg–Arg–Glu–Val–Arg–Gly–Val–Lys. **(c)** Não. As fitas antiparalelas complementares no DNA de dupla-fita não têm a mesma sequência de bases na direção 5'→3'. O RNA é transcrito especificamente a partir de uma das fitas do DNA de dupla-fita. Portanto, a RNA-polimerase deve reconhecer e se ligar à fita correta.

5. Existem dois tRNA para a metionina: tRNA^{Met}, que é o tRNA de iniciação, e o tRNA^{Met}, que insere resíduos de Met nas posições internas dos polipeptídeos. Somente o Met-tRNA^{Met} é reconhecido pelo fator de iniciação IF2 e ele se alinha com o AUG de iniciação posicionado no sítio P do complexo. Os códons AUG situados nas regiões internas do mRNA podem se ligar e incorporar apenas a Met-tRNA^{Met}.

6. (5')AUG-GGU-CGU-GAG-UGA-UGA-UUA-AUU-GUA-GCU-GGA-GGG-GAG-GAA-UGA(3') é traduzido em Met–Gly–Arg–Glu–Ser–Ser–Leu–Ile–Val–Ala–Gly–Gly–Glu–Glu–Trp. O comprimento do peptídeo é de 15, e não de 14, aminoácidos. São necessários 10 tRNA, um para cada tipo de aminoácido.

7. Permite que a polinucleotídeo-fosforilase atue sobre uma mistura de UDP e CDP, na qual a concentração de UDP está cinco vezes maior do que a concentração de CDP. O resultado seria um polímero sintético de RNA com muitas trincas UUU (codificando para Phe), um pequeno número de trincas UUC (Phe), UCU (Ser) e CUU (Leu), um número menor de UCC (Ser), CUC (Leu) e CCU (Pro) e um número ainda menor de CCC (Pro).

8. Um mínimo de 583 equivalentes de ATP (baseado em 4 por resíduo de aminoácido que é adicionado, exceto que são apenas 145 etapas de translocação). A correção de cada erro precisaria de 2 equivalentes de ATP. Para a síntese de glicogênio, são necessários 292 equivalentes de ATP. O custo extra de energia para a síntese da β -globina reflete o custo da informação que está contida na proteína. Pelo menos 20 enzimas ativadas, 70 proteínas ribossômicas, 4 rRNA, 32 ou mais tRNA, um mRNA e 10 ou mais enzimas auxiliares devem ser produzidas pelas células eucarióticas para sintetizar uma proteína a partir de aminoácidos. A síntese de uma cadeia ($\alpha 1 \rightarrow 4$) de glicogênio a partir da glicose necessita de 4 ou 5 enzimas (Capítulo 15).

9.

Códons da glicina	Anticódons
(5')GGU	(5')ACC, GCC, ICC
(5')GGC	(5')GCC, ICC
(5')GGA	(5')UCC, ICC
(5')GGG	(5')CCC, UCC

(a) A posição 3' e a do meio. **(b)** Pareando com os anticódons (5')GCC, ICC e UCC. **(c)** Pareando com os anticódons (5')ACC e CCC.

10. Somente **(a)**, **(c)**, **(e)** e **(g)**; **(b)**, **(d)** e **(f)** não podem ser resultantes de uma mutação de uma única base, pois para **(b)** e **(f)** seria necessário a substituição de duas bases e para **(d)** seria necessário substituir todas as três bases.

11. (5) AUGAUUUGCUAUCUUGGACU

Alterações:	CC	AU	U	C	C
	U		C	A	A
			G	G	G

14 das 63 alterações possíveis de uma base teriam como resultado o código inalterado.

12. Os dois códons de DNA para Glu são GAA e GAG, e os quatro códons de DNA para Val são GTT, GTC, GTA e GTG. A troca de uma única base em GAA para formar GTA ou em GAG para formar GTG poderia ser responsável pela substituição Glu → Val na hemoglobina da anemia falciforme. A troca de duas bases seria muito menos provável, de GAA para GTG, GTT ou GTC e de GAG para GTA, GTT ou GTC.

13. A isoleucina tem semelhança com a estrutura de vários outros aminoácidos, principalmente a valina. A distinção entre valina e isoleucina no processo de aminoacilação necessita de um segundo filtro, uma atividade de revisão. A histidina tem uma estrutura bem diferente da de qualquer outro aminoácido, possibilitando uma especificidade de ligação adequada para garantir a aminoacilação correta no seu respectivo tRNA.

14. **(a)** A Ala-tRNA-sintetase reconhece o par de bases G³-U⁷⁰ no braço do aminoácido do tRNA^{Ala}. **(b)** O tRNA^{Ala} mutante poderia inserir resíduos de Ala nos códons que codificam para Pro. **(c)** Uma mutação que pode levar a efeitos semelhantes é uma alteração do tRNA^{Pro} que permita que ele seja reconhecido e aminoacilado pela Ala-tRNA-sintetase. **(d)** A maioria das proteínas de uma célula poderia ser inativada, o que poderia ser uma mutação letal, de modo a nunca ser observada. Isso representa uma pressão seletiva muito forte para manter o código genético.

15. Os 15 mil ribossomos de uma célula de *E. coli* podem sintetizar 23 mil proteínas em 20 minutos.

16. IF2: o ribossomo 70S poderia se formar, mas os fatores de iniciação não seriam liberados, e, então, a fase de alongamento não poderia começar. EF-Tu: o segundo aminoacil-tRNA poderia se ligar ao sítio A de um ribossomo, mas não haveria formação de uma ligação peptídica. EF-G: a primeira ligação peptídica poderia ser formada, mas o ribossomo não se deslocaria ao longo do mRNA para liberar o sítio A para se ligar a um novo EF-Tu-tRNA.

17. O último aminoácido adicionado à cadeia polipeptídica nascente é o único que está ligado covalentemente a um tRNA e, portanto, é a única ligação entre o polipeptídeo e o mRNA que o codifica. A atividade de revisão poderia separar essa ligação, interrompendo a síntese do polipeptídeo e o liberando do mRNA.

18. O RNA ribossômico (rRNA) faz parte da estrutura dos ribossomos e é o principal componente de RNA isolado nas primeiras etapas da técnica de perfil ribossômico. Alguns protocolos incluem etapas para a remoção seletiva, ou redução da quantidade, de segmentos de rRNA nas amostras antes das etapas necessárias para converter RNA em DNA e, então, sequenciar o DNA.

19. A proteína pode ser direcionada ao RE, e o direcionamento daí para o local-alvo dependeria de sinais adicionais. O SRP se liga ao sinal aminoterminal logo no início da síntese proteica e direciona o polipeptídeo nascente e o ribossomo para os receptores no RE. Uma vez que a proteína é translocada para o lúmen do RE à medida que ela é sintetizada, o NLS nunca fica acessível para as proteínas destinadas ao núcleo.

20. O fator de desencadeamento é uma chaperona molecular que estabiliza uma conformação não enovelada e passível de translocação de ProOmpA.

21. Um DNA com, no mínimo, 5.784 pb; algumas das sequências codificantes podem estar agrupadas ou sobrepostas.

22. **(a)** As hélices se associam por meio do efeito hidrofóbico e de interações de van der Waals. **(b)** Os grupos R 3, 6, 7 e 10 se estendem para a esquerda, e os grupos R 1, 2, 4, 5, 8 e 9 se estendem para a direita. **(c)** Uma das sequências possíveis é

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
N–Phe–Ile–Glu–Val–Met–Asn–Ser–Ala–Phe–Gln–C

(d) Um sequenciamento de DNA possível para a sequência de aminoácidos em (c) é

Fita não molde

(5')TTTATTGAAGTAATGAATAGTGCATTCCAG(3')

|||||

(3')AAATAAATTTCATTACTTATCAGTAAGGTC(5')

Fita-molde

(e) Phe, Leu, Ile, Met e Val. Todos são hidrofóbicos, mas esse grupo não inclui todos os aminoácidos hidrofóbicos; estão faltando Trp, Pro e Ala.

(f) Tyr, His, Gln, Asn, Lys, Asp e Glu. Todos são hidrofílicos, embora Tyr seja menos hidrofílico que os demais. O grupo não inclui todos os aminoácidos hidrofílicos; Ser, Thr e Arg estão faltando. (g) Ao deixar T fora da mistura, exclui-se códons que começam ou terminam com T, portanto Tyr, que não é muito hidrofílica, fica excluída e, o mais importante, exclui os dois códons de término (TAA e TAG). Nenhum outro aminoácido do conjunto NAN é excluído pela falta de T. (h) Proteínas mal enoveladas geralmente são degradadas pelas células. Por isso, se um gene sintético produzir uma proteína que pode ser vista em um gel SDS, é provável que essa proteína tenha o enovelamento correto.

(i) O enovelamento das proteínas depende de algo mais do que o efeito hidrofóbico e de interações de van der Waals. Existem muitas razões pelas quais uma proteína sintetizada com uma sequência aleatória não se enovela em uma estrutura de quatro hélices. Por exemplo, as ligações de hidrogênio entre cadeias laterais hidrofílicas podem romper a estrutura. Além disso, nem todas as sequências têm igual tendência de formar α -hélice.

Capítulo 28

1. (a) Os níveis da triptofano-sintase permanecem altos mesmo na presença de triptofano. (b) Os níveis permanecem altos. (c) Os níveis diminuem rapidamente, evitando desperdício pela síntese de triptofano.

2. As células de *E. coli* produzem β -galactosidase quando elas são submetidas a altos níveis de agentes que lesam DNA, como a luz UV. Nessas condições, RecA liga-se a um DNA cromossômico de fita simples e facilita a clivagem autocatalítica do repressor LexA, liberando LexA do sítio onde se liga, permitindo, assim, a transcrição de genes a jusante.

3. (a) Constitutiva, baixo nível de expressão do operon; a maioria das mutações no operador podem fazer o repressor ter menor possibilidade de se ligar. (b) Tanto expressão constitutiva, como em (a), como repressão constante, caso a mutação destrua a capacidade de ligar lactose e compostos relacionados, destruindo, assim, a resposta a indutores. (c) Aumento ou diminuição da expressão do operador (sob condições nas quais ele é induzido), dependendo de se a mutação faz o promotor ter maior ou menor semelhança, respectivamente, com o promotor-consenso de *E. coli*.

4. Sete mil cópias.

5. 8×10^{-9} M, cerca de 10^5 vezes maior do que a constante de dissociação. Com 10 cópias do repressor ativo por célula, o sítio operador sempre terá uma molécula de repressor ligada.

6. (a) até (e). Em cada uma das situações, a expressão de genes do operon *lac* diminui.

7. (a) A atenuação é menor. O ribossomo, ao completar a tradução da sequência 1, não mais se sobrepõe para bloquear a sequência 2; a sequência 2 fica sempre disponível para parear com a sequência 3, prevenindo a formação da estrutura de atenuação. (b) Atenuação maior. A sequência 2 pareará com menos eficiência com a sequência 3; a estrutura do atenuador será formada com mais frequência, mesmo que a sequência 2 não esteja bloqueada por um ribossomo. (c) Sem atenuação. A regulação será conferida unicamente pelo repressor Trp. (d) A atenuação perde a afinidade para o Trp tRNA. Ela pode ficar sensível ao His tRNA. (e) A atenuação, se ocorresse, seria raramente. As sequências 2 e 3 sempre bloqueiam a formação do atenuador. (f) Atenuação permanente. Sempre haverá atenuação, independentemente da disponibilidade de triptofano.

8. Poderá não haver indução da resposta SOS, tornando a célula menos sensível a altos níveis de dano ao DNA.

9. Cada célula de *Salmonella* terá um flagelo formado por dois tipos de proteínas, e a célula ficará vulnerável a anticorpos gerados em resposta a qualquer uma das proteínas.

10. Um fator dissociável indispensável para a atividade (p. ex., um fator de especificidade semelhante à subunidade σ da enzima de *E. coli*) pode ter sido perdido durante a purificação da polimerase.

11.

Proteína Gal4

Domínio de ligação ao DNA de Gal4p	Domínio de ativação de Gal4p
------------------------------------	------------------------------

Proteína manipulada geneticamente

Domínio de ligação ao DNA do repressor Lac	Domínio ativador de Gal4p
--	---------------------------

A proteína manipulada geneticamente não pode se ligar ao sítio de ligação a Gal4p no sítio de ligação do gene *GAL* (UAS_G), pois ela não tem o domínio de Gal4p que liga DNA. Modifique o sítio de ligação a Gal4p ao DNA para que tenha uma sequência de nucleotídeos à qual o repressor Lac normalmente se liga (usando os métodos descritos no Capítulo 9).

12. Metilamina. A reação ocorre pelo ataque da água ao carbono guanidínico da arginina modificada.

13. A síntese proteica primeiro precisa da síntese de um mRNA longo o suficiente para codificar a proteína e para incluir as sequências de regulação necessárias, com o consumo de um nucleosídeo trifosfato para cada resíduo de nucleotídeo incorporado no mRNA. Então, o mRNA pode ser traduzido – um dos processos celulares que mais consomem energia (Capítulo 27). Para manter a repressão, a proteína repressora deveria ser sintetizada repetidamente. Com o uso de RNA como repressor, o RNA pode ser mais curto do que o mRNA que codifica para a proteína repressora e não haverá necessidade da etapa de tradução.

14. O mRNA de *bcd* necessário para o desenvolvimento é fornecido ao ovo pela mãe. O ovo fertilizado se desenvolve normalmente caso o genótipo seja *bcd*^{+/+}/*bcd*^{+/+}, desde que a mãe tenha um gene *bcd* normal e o alelo *bcd*⁻ seja recessivo. Entretanto, a fêmea adulta *bcd*⁻/*bcd*⁻ será estéril, uma vez que ela não tem um mRNA de *bcd* normal para fornecer aos seus ovos.

15. (a) Para uma expressão de 10% (90% de repressão), 10% do repressor está ligado ao indutor e 90% está livre e disponível para se ligar ao operador. Este cálculo utiliza a Equação 5-8 (p. 161), com $Y = 0,1$ e $K_d = 10^{-4}$ M:

$$Y = \frac{[IPTG]}{[IPTG] + K_d} = \frac{[IPTG]}{[IPTG] + 10^{-4} \text{ M}}$$

$$0,1 = \frac{[IPTG]}{[IPTG] + 10^{-4} \text{ M}}$$

então

$$0,9[IPTG] = 10^{-5} \quad \text{ou} \quad [IPTG] = 1,1 \times 10^{-5} \text{ M}$$

Para expressão de 90%, 90% do repressor está ligado ao indutor, então $Y = 0,9$. Colocando os valores de Y e K_d na Equação 5-8, tem-se $[IPTG] = 9 \times 10^{-4}$ M. Assim, a expressão do gene varia 10 vezes em função de uma variação de 10 vezes na $[IPTG]$. (b) Seria de esperar que os níveis da proteína fossem baixos antes da indução, aumentassem durante a indução e diminuíssem assim que a síntese fosse interrompida e as proteínas fossem degradadas. (c) Como mostrado em (a), o operon *lac* tem mais níveis de expressão do que apenas ligar e desligar, de modo que ele não tem a característica A. Como mostrado em (b) a expressão do operon *lac* diminui com a remoção do indutor e, assim, ele não tem a característica B. (d) *GFP-ligado*: rep^{ts} (a proteína produto do gene *rep*^{ts}) são expressos em altos níveis; rep^{ts} reprime OP₁, e, assim, LacI não é produzido. *GFP-desligado*: LacI é expressa em altos

níveis; LacI reprime OP_{lac} e, assim, não há produção de rep^{ts} e GFP. **(e)** O tratamento com IPTG muda o sistema de GFP-desligado para GFP-ligado. IPTG tem efeito apenas quando LacI estiver presente, de modo que afeta apenas o estado GFP-desligado. A adição de IPTG alivia a repressão de OP_{lac} , permitindo altos níveis de expressão de rep^{ts} , que, por sua vez, desliga a expressão de LacI, fazendo haver altos níveis de expressão de GFP. **(f)** O tratamento com calor muda o sistema de GFP-ligado para GFP-desligado. O calor tem efeito apenas quando rep^{ts} estiver presente e, assim, afeta apenas o estado GFP-ligado. O calor inativa rep^{ts} e alivia a repressão de OP_{lac} , possibilitando que LacI seja expresso em altos níveis. LacI, então, age em OP_{lac} para reprimir a síntese de rep^{ts} e GFP. **(g)** *Característica A*: o sistema não é estável no estado intermediário. Em algum ponto, um repressor agirá mais for-

temente do que o outro devido a flutuações aleatórias na expressão, o que impede a expressão do outro repressor e bloqueia o sistema em um dos estados. *Característica B*: uma vez que um repressor é expresso, ele impede a síntese do outro, de modo que o sistema permanece em um dos estados mesmo depois que o estímulo para mudança tenha sido removido. **(h)** Em nenhum momento qualquer célula expressará níveis intermediários de GFP, o que confirma a característica A. Em concentrações intermediárias **(X)** do indutor algumas células terão mudado para GFP-ligado e outras ainda não terão feito a mudança e permanecerão no estado GFP-desligado. Nenhuma célula ficará entre os dois estados. A distribuição bimodal dos níveis de expressão em $[IPTG] = X$ deve-se ao fato de haver uma população mista de células, células com GFP-ligado e células com GFP-desligado.

Glossário

a

absorção: transporte dos produtos da digestão do trato intestinal para o sangue.

aceptor de elétrons: substância que recebe elétrons em uma reação de oxidação-redução.

aceptor de próton: composto aniônico capaz de aceitar um próton de um doador; isto é, uma base.

ácido desoxirribonucleico: *Ver* DNA (ácido desoxirribonucleico).

ácido graxo: ácido carboxílico com uma longa cadeia alifática, encontrado em gorduras e óleos; é também um componente de fosfolípidos e glicolípidos de membrana.

ácido graxo insaturado: ácido graxo que contém uma ou mais ligações duplas.

ácido graxo poli-insaturado (AGPI): um ácido graxo com mais de uma ligação dupla, as quais geralmente não são conjugadas.

ácido graxo saturado: ácido graxo cuja cadeia alquila está totalmente saturada.

ácido hialurônico: polissacarídeo ácido de alto peso molecular, composto normalmente pelo dissacarídeo GlcUA(β 1 \rightarrow 3)GlcNAc; um dos principais componentes da matriz extracelular, formando complexos maiores (proteoglicanos) com proteínas ou com outros polissacarídeos ácidos. Também chamado de hialuronana.

ácido ribonucleico: *Ver* RNA (ácido ribonucleico).

ácidos biliares: derivados polares do colesterol, secretados pelo fígado no intestino, que servem para emulsionar as gorduras da alimentação, facilitando a ação da lipase.

ácidos graxos essenciais: ácidos graxos poli-insaturados produzidos pelas plantas, mas não pelos seres humanos, necessários na dieta humana.

ácidos nucleicos: polinucleotídeos de ocorrência biológica, nos quais os resíduos nucleotídicos estão unidos por ligações fosfodiéster em uma sequência específica; DNA e RNA.

acidose: condição metabólica na qual a capacidade do corpo de tamponar o H^+ está diminuída; é acompanhada geralmente por redução do pH sanguíneo.

acil-fosfato: qualquer molécula com a fórmula química geral $R-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-O-OP_3^{2-}$.

acoplamento quimiosmótico: acoplamento da síntese de ATP com a transferência de elétrons através de uma diferença de carga e de pH entre os dois lados da membrana.

actina: proteína que forma o filamento fino do músculo; é também um importante componente do citoesqueleto de muitas células eucarióticas.

açúcar redutor: açúcar cujo carbono da carbonila (anomérico) não está envolvido em ligação glicosídica e, portanto, pode sofrer oxidação.

açúcar-nucleosídeo-difosfato: carreador de uma molécula de açúcar, semelhante a uma coenzima, que atua na síntese enzimática de polissacarídeos e derivados de açúcares.

adenosina 3'-5'-monofosfato cíclico: *Ver* AMP cíclico (cAMP; adenosina 3'-5'-monofosfato cíclico).

adipócito: célula animal especializada no armazenamento de gordura (triacilgliceróis).

ADP (adenosina difosfato): ribonucleosídeo-5'-difosfato que serve como acceptor de grupo fosfato no ciclo energético da célula.

aeróbio: um organismo que vive exposto ao ar e usa oxigênio como acceptor final de elétrons na respiração.

aeróbico: que requer ou que ocorre na presença de oxigênio.

agente de oxidação (oxidante): o acceptor dos elétrons em uma reação de oxidação-redução.

agente de redução (reductor): o doador de elétrons em uma reação de oxidação-redução.

agonista: um composto, geralmente um hormônio ou neurotransmissor, que provoca uma resposta fisiológica quando se liga a um receptor específico.

AGPI: *Ver* ácido graxo poli-insaturado (AGPI).

ajuste induzido: alteração na conformação de uma enzima como resposta à ligação do substrato que a torna cataliticamente ativa; também usado para designar alterações na conformação de qualquer macromolécula em resposta à interação com ligantes, de modo a tornar o sítio de ligação da macromolécula mais ajustado à forma do ligante.

alça de DNA: a interação de proteínas ligadas em locais distantes em uma molécula de DNA com a formação de uma alça na molécula.

alça β : tipo de estrutura secundária proteica que consiste em quatro resíduos de aminoácidos arranjados em uma volta apertada, de forma que o polipeptídeo dobra sobre si mesmo.

alcalose: condição metabólica na qual a capacidade do corpo de tamponar OH^- está diminuída; geralmente acompanhada por um aumento no pH do sangue.

aldose: açúcar simples no qual o átomo de carbono da carbonila é um aldeído; isto é, o carbono da carbonila está em uma extremidade da cadeia de carbonos.

alvo mecanístico do complexo 1 da rapamicina: *Ver* mTORC1 (alvo mecanístico do complexo 1 da rapamicina).

amiloídoses: uma variedade de doenças progressivas caracterizadas por depósitos anormais de proteínas mal enoveladas em um ou mais órgãos ou tecidos.

aminoácidos: ácidos carboxílicos α -amino substituídos; as unidades formadoras das proteínas são α -aminoácidos.

aminoácidos essenciais: aminoácidos que não podem ser sintetizados pelos seres humanos e devem ser obtidos da dieta.

aminoácidos não essenciais: aminoácidos que podem ser produzidos pelos seres humanos e por outros vertebrados a partir de precursores mais simples e, portanto, desnecessários na dieta.

aminoacil-tRNA: éster aminoacil de um tRNA.

aminoacil-tRNA-sintetases: enzimas que catalisam a síntese de um aminoacil-tRNA à custa da energia do ATP.

aminotransferases: enzimas que catalisam a transferência de grupos amina de α -aminoácidos para α -cetoácidos; também chamadas de transaminases.

amoniótico: que excreta o excesso de nitrogênio α -amínico na forma de amônia.

AMP cíclico (cAMP; adenosina-3'-5'-monofosfato cíclico): segundo mensageiro; sua formação em uma célula pela adenilil-ciclase é estimulada por certos hormônios ou por outros sinais moleculares.

AMPK: *Ver* proteína-cinase ativada por AMP (AMPK).

anabolismo: a fase do metabolismo intermediário relacionada com a biossíntese dependente de energia dos componentes celulares a partir de precursores menores.

anaeróbio: organismo que vive sem oxigênio. Os anaeróbios obrigatórios morrem quando expostos ao oxigênio.

analito: molécula a ser analisada por espectrometria de massas.

análogo do estado de transição: molécula estável que lembra o estado de transição de uma determinada reação e, por isso, liga-se mais fortemente à enzima que catalisa a reação do que o substrato no complexo ES.

anamox: oxidação anaeróbica da amônia a N_2 , usando nitrito como acceptor de elétrons; realizada por bactérias quimiolitotróficas especializadas.

anemia falciforme: doença de seres humanos caracterizada por moléculas de hemoglobina defeituosas nos indivíduos homozigotos para um alelo mutante que codifica para a cadeia β da hemoglobina.

anfipático: que contém domínios polares e apolares.

anfólio: substância que pode atuar como base ou como ácido.

anfotérico: capaz de doar e de aceitar prótons, sendo, assim, capaz de atuar como ácido ou como base.

ångström (Å): uma unidade de comprimento (10^{-8} cm) usada para indicar dimensões moleculares.

ânidrido: o produto da condensação de dois grupos carboxila ou fosfato em que são eliminados os elementos da água, com formação de um composto com a estrutura geral $R-X-O-X-R$, na qual X é carbono ou fósforo.

anômeros: dois estereoisômeros de um dado açúcar que diferem somente na configuração do átomo de carbono da carbonila (anômérico).

anorexigênico: que tende a diminuir o apetite e o consumo de alimento. *Comparar com* orexigênico.

anotação ou apontamento genômico: processo de atribuição de funções reais ou prováveis a genes descobertos durante projetos de sequenciamento de DNA.

antagonista: composto que interfere na ação fisiológica de outra substância (o agonista), geralmente em um receptor de hormônio ou de neurotransmissor.

antibiótico: um de muitos compostos orgânicos formados e secretados por várias espécies de microrganismos e plantas, são tóxicos para outras espécies e supostamente têm função de defesa.

anticódon: sequência específica de três nucleotídeos no tRNA, complementar a um códon para um aminoácido no mRNA.

anticorpo: proteína de defesa sintetizada pelo sistema imune dos vertebrados. *Ver também* imunoglobulina.

anticorpos monoclonais: anticorpos produzidos por células de um hibridoma clonado, os quais são, dessa forma, idênticos e direcionados contra o mesmo epítipo do antígeno. (Híbridomas, células produtoras de anticorpos de forma estável que crescem em condições de cultivo celular, são criados pela fusão de linfócitos B produtores de anticorpos com células de mieloma.)

anticorpos policlonais: conjunto heterogêneo de anticorpos produzidos em um animal por diferentes linfócitos B em resposta a um antígeno. Anticorpos diferentes nesse conjunto reconhecem diferentes partes do antígeno.

antígeno: molécula capaz de provocar a síntese de um anticorpo específico nos vertebrados.

antiparalelo: descreve dois polímeros lineares opostos em polaridade ou orientação.

antiporte: cotransporte de dois solutos em sentidos opostos através de uma membrana.

apoenzima: a porção proteica de uma enzima, sem qualquer cofator orgânico ou inorgânico ou grupo prostético, os quais poderiam ser necessários para a atividade catalítica.

apolar: hidrofóbico; descreve moléculas ou grupos fracamente solúveis em água.

apolipoproteína: o componente proteico de uma lipoproteína.

apoproteína: a porção proteica de uma proteína, sem quaisquer cofatores orgânicos ou inorgânicos ou grupos prostéticos que possam ser necessários para a atividade.

apoptose: morte celular programada, na qual a célula realiza processos que levam a sua própria morte e lise por degradação sistemática de suas próprias macromoléculas, em resposta a um sinal do meio externo ou programado em seus genes.

aptâmero: oligonucleotídeo que se liga especificamente a um alvo molecular, em geral selecionado por um ciclo repetido de enriquecimento com base em afinidade (SELEX).

aquaporinas (AQP): uma família de proteínas integrais de membrana responsáveis por mediar o fluxo de água através das membranas.

arqueia: membros de Archaea, um dos três domínios de organismos vivos; inclui muitas espécies que vivem em ambientes extremos de alta força iônica, temperatura alta ou pH baixo.

atenuador: sequência de RNA envolvida na regulação da expressão de determinados genes; funciona como um terminador de transcrição.

ativação de aminoácido: esterificação enzimática dependente de ATP do grupo carboxila de um aminoácido com o grupo 3'-hidroxila do seu tRNA correspondente.

ativador: (1) proteína que se liga ao DNA e que regula positivamente a expressão de um ou mais genes; isto é, as taxas de transcrição aumentam quando o ativador está ligado ao DNA. (2) Modulador positivo de uma enzima alostérica.

atividade: a atividade termodinâmica real ou potencial de uma substância, que é diferente de sua concentração molar.

atividade específica: o número de micromoles (μmol) de um substrato transformado por uma preparação enzimática por minuto por miligrama de proteína a 25°C; uma medida da pureza da enzima.

atividade óptica: a capacidade de uma substância de girar o plano da luz polarizada.

átomo de carbono assimétrico: átomo de carbono ligado covalentemente a quatro grupos diferentes e que, portanto, pode existir em duas configurações tetraédricas diferentes.

ATP (adenosina trifosfato): ribonucleosídeo-5'-trifosfato que serve comoceptor de grupo fosfato no ciclo energético da célula; carrega energia química entre as vias metabólicas, servindo como intermediário compartilhado que acopla reações endergônicas e exergônicas.

ATPase: enzima que hidrolisa ATP e gera ADP e fosfato, reação geralmente acoplada a um processo que requer energia.

ATP-sintase: complexo enzimático que forma ATP a partir de ADP e fosfato durante a fosforilação oxidativa na membrana mitocondrial interna ou na membrana plasmática bacteriana e durante a fotofosforilação nos cloroplastos.

autofagia: degradação catabólica lisossômica de proteínas celulares e outros componentes.

autofosforilação: estritamente, a fosforilação de um resíduo de aminoácido em uma proteína em uma reação catalisada pela mesma molécula proteica; com frequência, o termo é ampliado para incluir a fosforilação de uma subunidade de um homodímero pela outra subunidade.

autótrofo: organismo que sintetiza suas próprias moléculas complexas a partir de fontes de carbono e nitrogênio muito simples, como dióxido de carbono e amônia.

auxina: um hormônio de crescimento de plantas.

b

bactéria: membro de Bacteria, um dos três domínios dos organismos vivos; as bactérias apresentam uma membrana plasmática, mas não possuem organelas internas ou núcleo.

bacteriófago: vírus capaz de se replicar em uma célula bacteriana; também denominado fago.

baculovírus: qualquer de um grupo de vírus com DNA dupla-fita, que infectam invertebrados, sobretudo insetos; amplamente usados para expressão proteica em biotecnologia.

Banco de Dados de Proteínas: *Ver* PDB (*Protein Data Bank*, ou Banco de Dados de Proteínas).

biblioteca de cDNA: coleção de fragmentos de DNA clonados derivados unicamente do complemento do mRNA que está sendo expresso em um organismo ou tipo celular específico sob um conjunto definido de condições.

biblioteca de DNA: coleção de fragmentos de DNA clonados.

biblioteca genômica: biblioteca de DNA contendo segmentos de DNA que representam todas (ou a maioria das) as sequências do genoma de um organismo.

bicamada: camada dupla de moléculas lipídicas anfipáticas orientadas, formando a estrutura básica das membranas biológicas. As caudas hidrocarbonadas estão voltadas para dentro e formam uma fase apolar contínua.

bioensaio: método de medida da quantidade de uma substância biologicamente ativa (como um hormônio) em uma amostra pela quantificação da resposta biológica a alíquotas dessa amostra.

bioinformática: a análise computadorizada de dados biológicos, com o uso de métodos derivados de estatística, linguística, matemática, química, bioquímica e física. Os dados são, com frequência, sequências de ácidos nucleicos ou de proteínas ou dados estruturais, mas podem também envolver outros dados experimentais, estatística de pacientes e materiais da literatura científica. A pesquisa em bioinformática enfoca métodos para armazenamento, recuperação e análise de dados.

biologia de sistemas: o estudo de sistemas bioquímicos complexos, integrando informações da genômica, da proteômica e da metabolômica.

biosfera: toda a matéria viva sobre ou dentro da terra, dos mares e da atmosfera.

biotina: uma vitamina; cofator enzimático em reações de carboxilação.

C

cadeia respiratória: a cadeia de transferência de elétrons; sequência de proteínas transportadoras de elétrons que os transferem dos substratos para o oxigênio molecular nas células aeróbicas.

caloria: a quantidade de calor necessária para elevar a temperatura de 1,0 g de água de 14,5 para 15,5°C. Uma caloria (cal) equivale a 4,18 joules (J).

cAMP: *Ver* AMP cíclico (cAMP; adenosina 3'-5'-monofosfato).

canal iônico: proteína integral que propicia o transporte regulado de um íon, ou íons, específico(s) através de uma membrana.

canalização: a transferência direta do produto de uma reação (intermediário comum) do sítio ativo de uma enzima para o sítio ativo da enzima que catalisa a próxima etapa da via.

canalização do substrato: movimento dos intermediários químicos em uma série de reações catalisadas por enzimas do sítio ativo de uma enzima para o da próxima na via, sem deixar a superfície do complexo proteico que inclui ambas as enzimas.

CAP: *Ver* proteína receptora de cAMP (CRP).

capsídeo: a cobertura proteica de um vírus ou de uma partícula viral.

carbânion: átomo de carbono carregado negativamente.

carbocátion: átomo de carbono carregado positivamente; também chamado de íon carbônio.

carboidrato: aldeído ou cetona poli-hidroxilado, ou substância que, por hidrólise, produza-os. Muitos carboidratos têm a fórmula empírica $(CH_2O)_n$; alguns também contêm nitrogênio, fósforo ou enxofre.

carbono anomérico: o átomo de carbono em uma sacarose que forma um novo centro quiral quando um açúcar cicliza para formar um hemiacetal. Esse é o carbono da carbonila dos aldeídos e das cetonas.

cardiolipina: fosfolípido de membrana no qual dois ácidos fosfatídicos compartilham um grupo polar glicerol.

carotenoides: pigmentos fotossintéticos lipossolúveis formados por unidades de isopreno.

carreador de elétrons: proteína, como citocromos ou flavoproteínas, que perde ou ganha elétrons de modo reversível; funciona na transferência de elétrons dos nutrientes orgânicos para o oxigênio ou algum outro aceptor final.

cascata: *Ver* cascata enzimática; cascata de regulação.

cascata de regulação: via de regulação com múltiplas etapas, na qual um sinal leva à ativação de uma série de proteínas em sequência, e cada proteína na sequência ativa cataliticamente a seguinte, de forma que o sinal original é amplificado de modo exponencial. *Ver também* cascata enzimática.

cascata enzimática: série de reações, frequentemente envolvidas em eventos de regulação, na qual uma enzima ativa outra (com frequência por fosforilação), que ativa uma terceira, e

assim por diante. O efeito de um catalisador ativando outro catalisador é uma grande amplificação do sinal que iniciou a cascata. *Ver também* cascata de regulação.

catabolismo: a fase do metabolismo intermediário relacionada com a degradação das moléculas de nutrientes com geração de energia.

catálise específica acidobásica: catálise ácida ou básica que envolve os constituintes da água (íons hidróxido ou hidrônio).

catálise geral acidobásica: catálise envolvendo transferência de prótons de ou para outra molécula que não a água.

catecolaminas: hormônios, como a adrenalina, que são derivados aminados do catecol.

catenano: duas ou mais moléculas poliméricas circulares interligadas por uma ou mais ligações topológicas não covalentes, lembrando os elos de uma cadeia.

cauda poli(A): extensão de resíduos de adenosina adicionada à extremidade 3' de muitos mRNA nos eucariotos (e, às vezes, nas bactérias).

cDNA: *Ver* DNA complementar (cDNA).

célula B: *Ver* linfócito B (célula B).

célula epitelial: todas as células que fazem parte da cobertura externa de um órgão ou organismo.

célula germinativa: tipo de célula animal que se forma no início da embriogênese e se multiplica por mitose ou produz, por meiose, células que se desenvolvem em gametas (óvulos ou espermatozoides).

célula T: *Ver* linfócito T (célula T).

células somáticas: todas as células do corpo, exceto as células germinativas.

células-tronco: as células autorregenerativas que originam células diferenciadas; por exemplo, células na medula óssea, que originam as células sanguíneas diferenciadas, como os eritrócitos e os linfócitos.

centrifugação diferencial: separação de organelas celulares ou de outras partículas de tamanhos diferentes por suas diferentes velocidades de sedimentação em um campo centrífugo.

centro de reação fotoquímica: a parte do complexo fotossintético onde a energia de um fóton absorvido causa separação de carga, iniciando a transferência eletrônica.

centro quiral: átomo com substituintes organizados de forma que a molécula não pode ser sobreposta à sua imagem especular.

centrômero: região especializada nos cromossomos, a qual serve de ponto de ligação ao fuso mitótico ou meiótico.

cerebrosídeo: esfingolípido que contém um resíduo de açúcar como grupo polar.

cetoacidose: condição patológica algumas vezes experimentada por indivíduos com diabetes melito não tratada, em que as concentrações dos corpos cetônicos acetoacetato e β -hidroxibutirato alcançam níveis extraordinários nos tecidos, na urina e no sangue (cetose), o que diminui o pH sanguíneo (acidose).

cetogênico: produz acetil-CoA, precursor da formação de corpos cetônicos como produto de degradação.

cetose: (1) monossacarídeo simples, no qual o grupo carbonila é uma cetona. (2) Condição na qual a concentração de corpos cetônicos no sangue, na urina e nos tecidos é anormalmente alta.

chaperona: qualquer de várias classes de proteínas ou complexos proteicos que catalisam o enovelamento correto de proteínas em todas as células.

chaperonina: uma de duas classes principais de chaperonas encontradas em praticamente todos os organismos; um complexo de proteínas que atua no enovelamento proteico: GroES/GroEL nas bactérias e Hsp60 nos eucariotos.

chip de DNA: designação informal de um microarranjo de DNA, que se refere ao pequeno tamanho dos microarranjos típicos.

ciclina: membro de uma família de proteínas que ativam as proteínas-quinase dependentes de ciclinas, regulando, desta forma, o ciclo celular.

ciclo da ureia: rota metabólica cíclica no fígado dos vertebrados que sintetiza ureia a partir de grupos amina e dióxido de carbono.

ciclo de Calvin: via cíclica em plantas que fixa o dióxido de carbono e produz trioses-fosfato.

ciclo de Krebs: *Ver* ciclo do ácido cítrico.

ciclo de substrato: ciclo de reações catalisadas por enzimas que resulta na liberação de energia térmica pela hidrólise de ATP; às vezes chamado de ciclo fútil.

ciclo do ácido cítrico: via cíclica de oxidação de resíduos acetila a dióxido de carbono, na qual a primeira etapa é a formação de citrato; também conhecido como ciclo de Krebs ou ciclo do ácido tricarbóxico.

ciclo do ácido tricarbóxico (CAT): *Ver* ciclo do ácido cítrico.

ciclo do glioxilato: variação do ciclo do ácido cítrico para a conversão líquida de acetato em succinato, produzindo, no final, um novo carboidrato; ocorre em bactérias e em algumas células de plantas.

ciclo do nitrogênio: a circulação de várias formas de nitrogênio, biologicamente disponível entre o mundo vegetal, animal e microbiano e entre a atmosfera e a geosfera.

ciclo fútil: *Ver* ciclo de substrato.

cinases: enzimas que catalisam a fosforilação de certas moléculas pelo ATP.

cinases dos receptores acoplados à proteína G (GRK): família de proteínas-quinase que fosforilam resíduos de Ser e Thr próximos à extremidade carboxila dos receptores acoplados à proteína G, iniciando sua internalização.

cinética: o estudo das velocidades das reações.

cinética de Michaelis-Menten: padrão cinético no qual a velocidade inicial de uma reação catalisada por enzima exibe uma dependência hipérbolica da concentração do substrato.

cístron: uma unidade de DNA ou RNA que corresponde a um gene.

citocina: membro de uma família de proteínas pequenas secretadas (como interleucinas ou interferons), que ativam a divisão celular ou a diferenciação pela ligação a receptores de membrana nas células-alvo.

citocinese: a separação final das células-filhas na mitose.

citocromo P-450: família de enzimas que contém heme, com banda de absorção característica em 450 nm e que participa de hidroxilações biológicas usando o O_2 .

citocromos: proteínas com grupo heme que servem como transportadoras de elétrons na respiração, na fotossíntese e em outras reações de oxidação-redução.

citoesqueleto: a rede filamentosa que garante ao citoplasma estrutura e organização; inclui filamentos de actina, de microtúbulos e filamentos intermediários.

citoplasma: a porção do conteúdo celular que está fora do núcleo, mas envolta pela membrana plasmática; inclui organelas, como as mitocôndrias.

citossol: a fase aquosa contínua do citoplasma, com seus solutos dissolvidos; exclui organelas, como as mitocôndrias.

clonagem: a produção de grandes quantidades de moléculas de DNA, células ou organismos idênticos a partir de uma única molécula de DNA, célula ou organismo ancestral.

clonagem de DNA: Ver clonagem.

clones: os descendentes de uma única célula.

clorofilas: família de pigmentos verdes que atuam como receptores da energia da luz na fotossíntese; complexos magnésio-porfirina.

cloroplastos: organelas fotossintéticas que contêm clorofila em algumas células eucarióticas.

cobalamina: Ver coenzima B_{12} .

código degenerado: código no qual um único elemento de uma linguagem é especificado por mais de um elemento em uma segunda linguagem.

código genético: conjunto de palavras em código de três letras no DNA (ou no mRNA) que codificam a sequência de aminoácidos das proteínas.

códon: sequência de três nucleotídeos adjacentes em um ácido nucleico que codifica para um aminoácido específico.

códon de início: AUG (às vezes GUG ou, mais raramente, UUG em bactérias e arqueobactérias); codifica o primeiro aminoácido de uma sequência polipeptídica: *N*-formilmetionina em bactérias; metionina em arqueobactérias e eucariotos.

códon sem sentido: códon que não especifica um aminoácido, mas sinaliza a terminação da cadeia polipeptídica.

códons de parada: Ver códons de término.

códons de término: UAA, UAG e UGA; na síntese proteica, esses códons sinalizam o término da síntese de uma cadeia polipeptídica. Também conhecidos como códons de parada.

coeficiente de Hill: medida da interação cooperativa entre subunidades proteicas.

coeficiente de partição: uma constante que expressa a razão em que um dado soluto será distribuído entre dois determinados líquidos imiscíveis no equilíbrio.

coeficiente de sedimentação: constante física que especifica a velocidade de sedimentação de uma partícula em um campo centrífugo sob condições específicas.

coenzima: cofator orgânico necessário para a ação de determinadas enzimas; com frequência tem um componente vitamínico.

coenzima A: coenzima que contém ácido pantotênico e que serve como transportador de grupos acila em determinadas reações enzimáticas.

coenzima B_{12} : cofator enzimático derivado da vitamina cobalamina, envolvido em determinados tipos de rearranjos de esqueletos carbonados.

cofator: íon inorgânico ou coenzima necessário para a atividade enzimática.

cognato: descreve duas biomoléculas que normalmente interagem; por exemplo, uma enzima e seu substrato comum, ou um receptor e seu ligante comum.

cointegrado: intermediário na migração de determinados transposons de DNA, na qual o DNA doador e o DNA-alvo estão ligados covalentemente.

complementar: uma superfície molecular com grupos químicos organizados para interagir especificamente com grupos químicos em outra molécula.

complexo da nitrogenase: sistema de enzimas capaz de reduzir o nitrogênio atmosférico em amônia na presença de ATP.

complexo de Golgi: organela membranosa complexa das células eucarióticas; atua na modificação pós-traducional de proteínas e na sua secreção da célula ou incorporação na membrana plasmática ou nas membranas das organelas.

complexo de iniciação: complexo formado por um ribossomo, um mRNA e o iniciador Met-tRNA^{Met} ou fMet-tRNA^{fMet}, pronto para as etapas de alongamento.

composto quiral: composto que contém um centro assimétrico (átomo quiral ou centro quiral) e, portanto, existe em duas formas que não se sobrepõem (são imagens especulares uma da outra; enantiômeros).

condensação: tipo de reação em que dois componentes são unidos com eliminação de água.

condroitin-sulfato: uma das famílias de glicosaminoglicanos sulfatados; um importante componente principal da matriz extracelular.

configuração: a organização espacial de uma molécula orgânica que é dada pela presença de (1) ligações duplas, em volta das quais não há livre rotação, ou (2) centros quirais, em volta dos quais os grupos substituintes estão organizados em uma sequência específica. Os isômeros de configuração só podem ser inter-

convertidos com a quebra de uma ou mais ligações covalentes.

configuração absoluta: a configuração de quatro grupos substituintes diferentes ao redor de um átomo de carbono assimétrico, com referência ao D e ao L-gliceraldeído.

conformação: organização espacial de grupos substituintes que estão livres para assumir diferentes posições no espaço, sem romper nenhuma ligação, em virtude da liberdade de rotação da ligação.

conformação nativa: a conformação biologicamente ativa de uma macromolécula.

conformação β : arranjo estendido, em ziguezague, de uma cadeia polipeptídica; uma estrutura secundária comum nas proteínas.

constante de dissociação (K_d): constante de equilíbrio da dissociação de um complexo de duas ou mais biomoléculas em seus componentes; por exemplo, a dissociação de um substrato de sua enzima.

constante de dissociação de ácidos: a constante de dissociação (K_a) de um ácido, que descreve sua dissociação em sua base conjugada e um próton.

constante de equilíbrio (K_{eq}): constante característica de cada reação química que relaciona as concentrações específicas de todos os reagentes e produtos no equilíbrio em uma dada temperatura e pressão.

constante de Michaelis (K_m): a concentração do substrato na qual uma reação catalisada por enzima alcança a metade da sua velocidade máxima.

constante de velocidade: a constante de proporcionalidade que relaciona a velocidade de uma reação química à concentração dos reagentes.

contig: série de clones sobrepostos ou uma sequência que define uma seção contínua de um cromossomo.

controle combinatório: uso de combinações de um repertório limitado de proteínas reguladoras para prover regulação gene-específica de muitos genes individuais.

controle da tradução: regulação da síntese de uma proteína pela regulação da taxa de sua tradução no ribossomo.

controle metabólico: o mecanismo pelo qual o fluxo por uma via metabólica se altera, refletindo condições celulares alteradas.

controle pelo aceptor: regulação da taxa de respiração pela disponibilidade de ADP como aceptor de grupo fosfato.

controle transcricional: regulação da síntese de uma proteína pela regulação da formação de seu mRNA.

cooperatividade: a característica de uma enzima ou de outra proteína na qual a interação com a primeira molécula do ligante altera a afinidade pela segunda molécula. Na cooperatividade positiva, a afinidade pelo segundo ligante aumenta; na cooperatividade negativa, diminui.

cooperatividade negativa: propriedade de algumas proteínas ou enzimas com multissubunidades,

na qual a interação de um ligante ou do substrato com uma das subunidades prejudica a interação com outra subunidade.

cooperatividade positiva: propriedade de algumas enzimas ou proteínas multiméricas, na qual a interação do substrato ou de um ligante com uma subunidade facilita a ligação em outra subunidade.

corpos cetônicos: acetoacetato, D- β -hidroxibutirato e acetona; combustíveis hidrossolúveis normalmente exportados pelo fígado, mas produzidos em excesso durante o jejum e no diabetes melito não tratado.

cotransporte: o transporte simultâneo de dois solutos através de uma membrana, feito por um único transportador. *Ver também* antipor-te; simporte.

criomicroscopia crioelétrica (crio-EM): técnica utilizada na determinação da estrutura de proteínas ou complexos proteicos; moléculas individuais são espalhadas sobre uma grade em orientações ao acaso, rapidamente congeladas para preservar a integridade da amostra e visualizadas por microscopia eletrônica. Imagens de moléculas individuais sofrem rotação por meio de computadores para otimizar sua coincidência, gerando estruturas tridimensionais.

CRISPR RNA de ativação em trans (tracrRNA): RNA codificado por bactérias, necessário para a ativação e a função do sistema relativamente simples CRISPR/Cas no patógeno humano *Streptococcus pyogenes*.

CRISPR/Cas: sistemas bacterianos que evoluíram para fornecer uma defesa contra infecções por bacteriófagos. CRISPR vem de curtas repetições palindrômicas agrupadas e regularmente espaçadas (do inglês, *clustered, regularly interspaced short palindromic repeats*). Cas vem de associado a CRISP (do inglês, *CRISPR-associated*). Sistemas CRISPR/Cas produzidos por engenharia genética são utilizados para a edição eficiente de genomas-alvo em um amplo espectro de organismos.

cristalografia por raios X: a análise de padrões de difração de raios X de um composto cristalino, usada para determinar a estrutura tridimensional de moléculas.

cristas: dobras da membrana mitocondrial interna.

cromatina: complexo filamentosos de DNA, histonas e outras proteínas, que constitui o cromossomo eucariótico.

cromatóforo: composto, ou parte dele (natural ou sintético), que absorve a luz visível ou a ultravioleta.

cromatografia: processo no qual misturas complexas de moléculas são separadas por muitas partições repetidas entre uma fase que flui (móvel) e uma fase estacionária.

cromatografia de exclusão por tamanho: procedimento para a separação de moléculas por tamanho, com base na capacidade que polímeros porosos têm de excluir solutos acima de determinado tamanho; também chamada de filtração em gel.

cromatografia de troca iônica: processo de separação de misturas complexas de compostos iônicos pela partição repetida várias vezes entre uma fase móvel (eluente) e uma fase estacionária, que consiste em uma resina polimérica que contém grupos carregados fixados a ela.

cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC): procedimento cromatográfico, com frequência conduzido sob pressões relativamente altas, com o uso de equipamento automático, que produz perfis refinados e altamente reproduzíveis.

cromossomo: grande e única molécula de DNA e suas proteínas associadas, que contém muitos genes; armazena e transmite informação genética.

CRP: *Ver* proteína receptora de cAMP (CRP).

cruciforme: estrutura secundária do RNA dupla-fita ou do DNA, na qual a dupla-hélice é desnaturada em sequências palindrômicas repetidas em ambas as fitas, e cada fita separada parecia internamente, formando estruturas em grampo opostas. *Ver também* grampo.

cultura de tecidos: método pelo qual as células derivadas de organismos multicelulares são cultivadas em meio líquido.

curva de titulação: gráfico do pH *versus* os equivalentes de base adicionados durante a titulação de um ácido.

d

dáton: unidade de massa molecular ou atômica; 1 dáton (Da) corresponde à massa de um átomo de hidrogênio ($1,66 \times 10^{-24}$ g).

dado de zinco: motivo proteico especializado em algumas proteínas que ligam DNA, envolvido no reconhecimento do DNA; caracteriza-se por apresentar um único átomo de zinco coordenado a quatro resíduos de Cys ou a dois resíduos de His e dois de Cys.

ΔG : *Ver* variação de energia livre (ΔG).

ΔG° : *Ver* variação de energia livre padrão (ΔG°).

ΔG^\ddagger : *Ver* energia de ativação (ΔG^\ddagger).

densidade de super hélice (σ): em uma molécula helicoidal como o DNA, é o número de supertorções (voltas super-helicoidais) em relação ao número de voltas na molécula relaxada.

desaminação: a remoção enzimática de grupos amina das biomoléculas, como os aminoácidos ou nucleotídeos.

desidrogenases: enzimas que catalisam a remoção de pares de átomos de hidrogênio dos substratos.

desidrogenases ligadas à flavina: desidrogenases que requerem uma das coenzimas de riboflavina, FMN ou FAD.

desnaturação: desenovelamento parcial ou total da conformação nativa específica de uma cadeia polipeptídica, uma proteína ou um ácido nucleico com a consequente perda da função da molécula.

desoxirribonucleotídeos: nucleotídeos com a 2-desóxi-D-ribose como o componente pentose.

dessaturases: enzimas que catalisam a introdução de ligações duplas na cadeia hidrocarbonada dos ácidos graxos.

dessensibilização: processo universal pelo qual mecanismos sensoriais param de responder após exposição prolongada ao estímulo específico detectado por eles.

dessolvatação: a liberação da água ligada ao redor do soluto em uma solução aquosa.

diabetes melito: grupo de doenças metabólicas, cujos sintomas resultam de uma deficiência na produção ou na utilização da insulina; caracterizada por uma deficiência no transporte da glicose do sangue para as células em concentrações normais desse açúcar.

diabetes melito tipo 2: uma doença metabólica caracterizada por resistência à insulina e regulação deficiente dos níveis de glicose no sangue; também conhecida como diabetes com início no adulto ou diabetes não dependente de insulina.

diagrama de topologia: representação estrutural em que as conexões entre os elementos da estrutura secundária são mostradas em duas dimensões.

diálise: remoção de moléculas pequenas de uma solução contendo macromoléculas por meio de sua difusão através de uma membrana semipermeável em uma solução tampão adequada.

diferenciação: especialização estrutural e funcional das células durante o crescimento e o desenvolvimento.

diferenciação celular: processo no qual uma célula precursora se especializa para desempenhar uma função específica, pela aquisição de um novo conjunto de proteínas e RNA.

difusão: o movimento efetivo de moléculas no sentido da concentração mais baixa.

difusão simples: o movimento de moléculas do soluto através de uma membrana para uma região de concentração mais baixa, sem auxílio de transportador proteico.

digestão: hidrólise enzimática dos nutrientes principais no sistema gastrointestinal, produzindo seus componentes mais simples.

dímero de pirimidina: dímero de dois resíduos de pirimidina adjacentes no DNA, unidos covalentemente; sua formação é induzida pela absorção da luz UV; derivado mais comumente de duas timinas adjacentes (dímero de timina).

dímero de timina: *Ver* dímero de pirimidina.

diploide: que tem dois conjuntos de informação genética; descreve uma célula com dois cromossomos de cada tipo. *Comparar com* haploide.

dissacarídeo: carboidrato formado por duas unidades monossacarídicas, unidas por ligação covalente.

DNA (ácido desoxirribonucleico): polinucleotídeo com uma sequência específica de unidades desoxirribonucleotídicas unidas covalentemente por ligações 3'-5'-fosfodiéster; serve como o portador da informação genética.

DNA complementar (cDNA): DNA complementar a um mRNA específico, usado na clonagem de DNA; geralmente gerado utilizando a transcriptase reversa.

DNA de sequência simples: *Ver* DNA satélite.

DNA recombinante: DNA formado pela junção de genes em novas combinações.

DNA relaxado: qualquer DNA que exista em sua estrutura mais estável e não tensionada, normalmente a forma B sob a maioria das condições celulares.

DNA satélite: segmentos de DNA altamente repetidos e não traduzidos nos cromossomos eucarióticos; com mais frequência associados às regiões centroméricas. Sua função é desconhecida. Também chamados de DNA de sequência simples.

DNA supertorcido: DNA que se torce sobre si mesmo por estar sub ou superenrolado (e, por isso, tensionado) em relação ao DNA na forma B.

DNA-ligasas: enzimas que criam uma ligação fosfodiéster entre a extremidade 3' de um segmento de DNA e a extremidade 5' de outro.

DNA-polimerases: enzimas que catalisam a síntese de DNA dependente de molde a partir de precursores, os desoxirribonucleosídeos-5'-trifosfato. A bactéria *Escherichia coli* tem cinco DNA-polimerases, numeradas de I a V; os eucariotos têm um número maior dessas enzimas.

doador de elétrons: substância que doa elétrons em uma reação de oxidação-redução.

doador de próton: o doador de um próton em uma reação acidobásica; isto é, um ácido.

dogma central: o princípio de organização da biologia molecular: a informação genética flui do DNA para o RNA e deste para a proteína.

domínio: unidade estrutural distinta de um polipeptídeo; os domínios podem ter funções separadas e podem dobrar-se como unidades compactas independentes.

domínio SH2: domínio proteico que se liga firmemente a um resíduo de fosfotirosina em determinadas proteínas, como os receptores Tyr-cinases, iniciando a formação de um complexo multiproteico que atua em uma via de sinalização.

dupla-hélice: a conformação normal enrolada de duas cadeias de DNA antiparalelas e complementares.

E

E° : *Ver* potencial de redução padrão (E°).

edição de RNA: modificação pós-transcricional de um mRNA que altera o significado de um ou mais códons durante a tradução.

efeito hidrofóbico: a agregação de moléculas apolares em solução aquosa, com exclusão das moléculas de água; causada principalmente por um efeito entrópico relacionado à estruturação com ligações de hidrogênio da água ao redor.

efeito hipercrômico: o grande aumento na absorção de luz a 260 nm que ocorre quando uma dupla-hélice de DNA se desenrola (desnaturação).

elemento de resposta: região do DNA próxima a um gene (a montante deste), que pode estar ligada por proteínas específicas que influenciam a taxa de transcrição do gene.

elemento de resposta a hormônios (HRE): sequência curta de DNA (12 a 20 pb) à qual se ligam receptores para hormônios esteroides, retinoides, da tireoide e da vitamina D, alterando a expressão dos genes contíguos. Cada hormônio tem uma sequência-consenso que é preferida pelo respectivo receptor.

eletrofílico: grupo deficiente em elétrons com forte tendência de aceitá-los de um grupo rico em elétrons (nucleófilo).

eletroforese: movimento de solutos carregados em resposta a um campo elétrico; utilizada com frequência para separar misturas de íons, proteínas ou ácidos nucleicos.

eletrogênico: que contribui para um potencial elétrico através de uma membrana.

ELISA: *Ver* ensaio de imunoadsorção ligado a enzima (ELISA).

eluato: o efluente de uma coluna cromatográfica.

enantiômeros: estereoisômeros que são imagens especulares não sobreponíveis um do outro.

endereçoamento de proteínas: o processo pelo qual as novas proteínas sintetizadas são selecionadas e transportadas para seus locais corretos na célula.

endocanabinoide: substância endógena capaz de se ligar a receptores canabinoides, ativando-os.

endocitose: a captação de material extracelular com inclusão em vesículas (endossomos) formadas pela invaginação da membrana plasmática.

endócrina: refere-se a secreções celulares que entram na corrente sanguínea e exercem seus efeitos em tecidos distantes.

endonucleases: enzimas que hidrolisam as ligações fosfodiéster internas de um ácido nucleico; isto é, não atuam sobre ligações das extremidades.

endonucleases de restrição: endonucleases sítio-específicas que clivam ambas as fitas do DNA em pontos dentro ou próximos do sítio específico reconhecido pela enzima; ferramentas importantes na engenharia genética.

energia da ligação: a energia derivada de interações não covalentes entre enzima e substrato ou receptor e ligante.

energia de ativação (ΔG^{\ddagger}): a quantidade de energia (em joules) necessária para converter todas as moléculas de 1 mol de uma substância reagente do estado mais estável para o estado de transição.

energia de ligação: a energia necessária para romper uma ligação.

energia livre (ΔG): a fração da energia total de um sistema que pode executar trabalho em temperatura e pressão constantes.

energia livre de ativação (ΔG^{\ddagger}): *Ver* energia de ativação (ΔG^{\ddagger}).

engenharia genética: qualquer processo pelo qual o material genético, particularmente o DNA, é alterado por um biólogo molecular.

enovelamento: *Ver* motivo.

ensaio imunoadsorção ligado à enzima (ELISA): um imunoensaio de alta sensibilidade, que utiliza uma enzima ligada a um anticorpo ou a um antígeno para detectar uma determinada proteína.

entalpia (H): o conteúdo de calor de um sistema.

entropia (S): o grau de desordem de um sistema.

enzima: biomolécula, proteína ou RNA, que catalisa uma reação química específica. Ela não afeta o equilíbrio da reação catalisada; ela aumenta a velocidade da reação por proporcionar uma via de reação com energia de ativação mais baixa.

enzima alostérica: enzima reguladora com atividade catalítica modulada pela ligação não covalente de um metabólito específico a um sítio, distinto do sítio ativo.

enzima de regulação: enzima com função de regulação, podendo ter sua atividade catalítica alterada por mecanismos alostéricos ou por modificação covalente.

enzima heterotrófica: enzima alostérica que requer um modulador diferente do seu substrato.

enzima homotrófica: enzima alostérica que usa seu substrato como modulador.

enzima reprimível: em bactérias, uma enzima cuja síntese é inibida quando o produto de sua reação está facilmente disponível para a célula.

enzimas constitutivas: enzimas necessárias sempre para a célula e presentes em um nível constante; por exemplo, muitas enzimas das rotas metabólicas centrais.

enzimas plurifuncionais (moonlighting): enzimas que têm duas funções distintas, e pelo menos uma delas é catalítica; a outra pode ser catalítica, estrutural ou de regulação.

epigenético: descreve qualquer característica relacionada ao material genético de um organismo vivo adquirida por um meio que não envolva a sequência nucleotídica dos cromossomos parentais; por exemplo, modificações covalentes de histonas.

epimerases: enzimas que catalisam a interconversão reversível de dois epímeros.

epímeros: dois estereoisômeros que diferem na configuração de um dos centros assimétricos de um composto que tem dois ou mais centros assimétricos.

epítipo: determinante antigênico; grupo(s) químico(s) específico(s) em uma macromolécula (antígeno) ao(s) qual(is) um dado anticorpo se liga.

equação de Henderson-Hasselbalch: uma equação relacionando pH, pK_a e razão entre concentrações de substânciasceptoras de prótons (A^-) e doadoras de prótons (HA) em uma solução: $pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$.

equação de Lineweaver-Burk: transformação algébrica da equação de Michaelis-Menten, que permite a determinação de V_{\max} e K_m pela extrapolação da [S] ao infinito: $\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\max}[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$.

equação de Michaelis-Menten: equação que descreve a dependência hiperbólica da velocidade inicial da reação, V_0 , da concentração do substrato, [S], em muitas reações catalisadas por enzimas: $V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$.

equilíbrio: o estado de um sistema no qual não ocorre nenhuma mudança efetiva; a energia livre está no seu mínimo.

equivalente de redução: termo geral para um elétron ou um equivalente de elétron na forma de um átomo de hidrogênio ou de um íon hidreto.

equivalente redutor: a extremidade de um polisacarídeo que possui o açúcar terminal com um carbono anomérico livre; o resíduo terminal pode atuar como um açúcar redutor.

eritrócito: célula que contém grandes quantidades de hemoglobina e é especializada no transporte de oxigênio; uma célula vermelha.

ERO: Ver espécies reativas de oxigênio (ERO).

escolha do sítio poli(A): a clivagem da cadeia de um mRNA transcrito com adição de uma sequência 3'-poli(A) em localizações alternativas, de modo a gerar diferentes mRNA maduros.

esfingolípido: lipídeo anfipático com um esqueleto de esfingosina, ao qual estão ligados um ácido graxo de cadeia longa e um álcool polar.

espécies reativas de oxigênio (ERO): produtos altamente reativos, originados da redução parcial do O_2 , incluindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido ($^{\cdot}O_2^-$) e radical livre hidroxila ($^{\cdot}OH$), produzidos como subprodutos secundários durante o fluxo de elétrons na cadeia respiratória.

especificidade: a capacidade de uma enzima ou de um receptor de diferenciar entre substratos ou ligantes competindo entre si.

espectro de ação: gráfico da eficiência da luz em promover um processo dependente de luz, como a fotossíntese, como uma função do comprimento de onda.

espectroscopia CD: Ver espectroscopia de dicroísmo circular (CD).

espectroscopia de dicroísmo circular (CD): método usado para caracterizar o grau de enovelamento de uma proteína, com base nas diferenças de absorção da luz circularmente polarizada, seja para a direita ou para a esquerda.

spliceossomo: um complexo de RNA e proteínas envolvido no *splicing* de mRNA nas células eucarióticas.

esquema Z: a trajetória dos elétrons na fotossíntese oxigênica, a partir da água, passando pelo fotossistema II e pelo complexo citocromo b_6f até o fotossistema I e, por fim, o NADPH. Quando a sequência de carreadores de elétrons é colocada em um gráfico contra seus potenciais de redução, a trajetória dos elétrons se assemelha a um Z.

estado basal: a forma normal, estável, de um átomo ou molécula; diferente do estado excitado.

estado de transição: a forma ativada de uma molécula quando ela sofreu uma reação química parcial; o ponto mais alto na coordenada da reação.

estado estacionário: estado de não equilíbrio de um sistema pelo qual a matéria está fluindo e no qual todos os componentes permanecem em concentração constante.

estado excitado: estado rico em energia de um átomo ou molécula, produzido pela absorção de energia da luz; diferente do estado basal.

estado pré-estacionário: em uma reação enzimática, o período que precede o estabelecimento do estado estacionário, muitas vezes englobando apenas a primeira renovação (regeneração) enzimática.

estatina: molécula de uma classe de fármacos usados para reduzir o colesterol sanguíneo em seres humanos; atua na inibição da enzima HMG-CoA-redutase, etapa inicial na síntese do colesterol.

estereoisômeros: compostos que têm a mesma composição e a mesma ordem de conexões atômicas, mas organização molecular diferente.

esterol: lipídeo que contém o núcleo esteroide.

estroma: o espaço e a solução aquosa circundados pela membrana interna de um cloroplasto, não incluindo o conteúdo nas membranas tilacoides.

estrutura primária: a descrição do esqueleto covalente de um polímero (macromolécula), incluindo a sequência das subunidades monoméricas e todas as ligações covalentes intra e intercadeia.

estrutura quaternária: a estrutura tridimensional de uma proteína multimérica, particularmente a maneira pela qual as subunidades se encaixam.

estrutura secundária: o arranjo espacial localizado dos átomos da cadeia principal em um segmento de polímero (polipeptídeo ou polinucleotídeo).

estrutura supersecundária: Ver motivo.

estrutura terciária: a conformação tridimensional de um polímero no seu estado de enovelamento nativo.

etapa limitante da velocidade: (1) Em geral, a etapa de uma reação enzimática com a maior energia de ativação ou o estado de transição com a energia livre mais alta. (2) A etapa mais lenta de uma via metabólica.

eucariotos: membros de Eukarya, um dos três domínios em que se dividem os organismos vivos; organismos unicelulares ou multicelulares.

lulares, cujas células apresentam um núcleo delimitado por membrana, múltiplos cromossomos e organelas internas.

eucromatina: regiões dos cromossomos na interfase que estão mais abertas (menos condensadas), cujos genes estão sendo ativamente expressos. *Comparar com* heterocromatina.

exocitose: a fusão de uma vesícula intracelular com a membrana plasmática, com a liberação do seu conteúdo no espaço extracelular.

éxon: o segmento de um gene eucariótico que codifica uma parte do produto final do gene; um segmento de RNA que permanece após o processamento pós-transcricional e é traduzido em uma proteína ou incorporado na estrutura de um RNA. *Ver também* íntron.

exonucleases: enzimas que hidrolisam somente as ligações fosfodiéster que estão nas extremidades dos ácidos nucleicos.

expressão gênica: transcrição e, no caso de proteínas, tradução, com a geração do produto de um gene; um gene se expressa quando seu produto biológico está presente e ativo.

extensão: o comprimento de um ácido nucleico medido ao longo do seu eixo helicoidal.

extra-hepático: descreve todos os tecidos fora do fígado; implica uma função central do fígado no metabolismo.

extremidade 3': a extremidade de um ácido nucleico onde não existe um nucleotídeo ligado à posição 3' do resíduo terminal.

extremidade 5': a extremidade de um ácido nucleico onde não existe um nucleotídeo ligado à posição 5' do resíduo terminal.

extremidades adesivas: duas extremidades na mesma molécula de DNA, ou em moléculas diferentes, com segmentos de fita simples curtos que se projetam um sobre o outro e são complementares, facilitando a ligação das extremidades. Também conhecidas como extremidades coesivas.

extremidades coesivas: *Ver* extremidades adesivas.

f

F_1 -ATPase: subunidade com múltiplas proteínas da ATP-sintase, onde estão localizados os sítios catalíticos para a síntese de ATP. Interage com a subunidade F_0 da ATP-sintase, acoplando o movimento dos prótons à síntese de ATP.

FAD (flavina-adenina dinucleotídeo): a coenzima de algumas enzimas de oxidação-redução; contém riboflavina.

fago: *Ver* bacteriófago.

fase de leitura: conjunto contíguo, não sobreposto de códons de três nucleotídeos no DNA ou RNA.

fase de leitura aberta (ORF): grupo de códons nucleotídicos contíguos, não sobrepostos, na molécula de um DNA ou RNA que não inclui um códon de término.

fator de transcrição: nos eucariotos, é uma proteína que afeta a regulação e o início da transcrição de um gene pela ligação a uma sequência reguladora próxima ou dentro do gene e pela

interação com a RNA-polimerase e/ou outros fatores de transcrição.

fatores de alongamento: (1) proteínas que atuam na fase de alongamento da transcrição eucariótica. (2) Proteínas específicas necessárias no alongamento das cadeias polipeptídicas pelos ribossomos.

fatores de crescimento: proteínas ou outras moléculas que representam sinais de fora da célula e estimulam o crescimento e a divisão.

fatores de liberação: *Ver* fatores de terminação.

fatores de terminação: fatores proteicos encontrados no citosol necessários para a liberação do ribossomo de uma cadeia polipeptídica completa; também conhecidos como fatores de liberação.

fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEF): proteínas reguladoras que se ligam às proteínas G e as ativam pela estimulação da troca de GDP por GTP.

fenótipo: as características observáveis de um organismo.

fermentação: degradação anaeróbica geradora de energia de um nutriente, como glicose, sem oxidação; produz lactato, etanol e alguns outros produtos simples.

fermentação alcoólica: *Ver* fermentação etanólica.

fermentação etanólica: a conversão anaeróbica da glicose em etanol via glicólise; também chamada de fermentação alcoólica. *Ver também* fermentação.

fibrina: fator proteico que forma as fibras que estabelecem uma rede, formando os coágulos sanguíneos.

fibrinogênio: o precursor proteico inativo da fibrina.

fibroblasto: célula do tecido conectivo que secreta proteínas, como o colágeno.

filtração em gel: *Ver* cromatografia por exclusão de tamanho.

fita codificadora: na transcrição do DNA, a fita de DNA idêntica em sequência de bases ao RNA que está sendo transcrito, com U no RNA em lugar de T no DNA; diferente da fita-molde. Também chamada de fita não molde.

fita líder: fita de DNA que, durante a replicação, é sintetizada no mesmo sentido daquele ao longo do qual a forquilha de replicação se desloca.

fita-molde: fita de ácido nucleico usada por uma polimerase como molde para a síntese da fita complementar, diferente da fita codificadora.

fita não molde: *Ver* fita codificadora.

fita tardia: a fita de DNA que, durante a replicação, deve ser sintetizada no sentido oposto ao daquele em que a forquilha de replicação se desloca.

fixação do nitrogênio: conversão do nitrogênio atmosférico (N_2) em formas reduzidas e biologicamente disponíveis pelos organismos fixadores de nitrogênio.

flagelo: apêndice celular usado para propulsão. Os flagelos bacterianos têm uma estrutura

muito mais simples do que os flagelos eucarióticos, os quais são semelhantes aos cílios.

flavoproteína: enzima que contém um nucleotídeo de flavina como grupo prostético firmemente ligado.

flipases: proteínas de membrana pertencentes à família de transportadores ABC que catalisam o deslocamento dos fosfolipídeos do folheto (monocamada) extracelular para o folheto citosólico de uma bicamada lipídica.

flip-flopases: proteínas de membrana que catalisam o movimento dos fosfolipídeos por meio da bicamada, levando a uma distribuição uniforme de um lipídeo entre os dois folhetos (monocamadas) da membrana.

flopases: proteínas de membrana da família dos transportadores ABC que catalisam o deslocamento de fosfolipídeos do folheto (monocamada) intracelular da bicamada da membrana para a camada extracelular.

fluorescência: emissão de luz por moléculas excitadas quando retornam ao estado mais estável.

fluxo ácido de elétrons: o fluxo de elétrons, induzido pela luz, da água para o $NADP^+$ na fotossíntese produtora de oxigênio: envolve os fotossistemas I e II.

fluxo cíclico de elétrons: nos cloroplastos, o fluxo de elétrons induzido pela luz se origina no fotossistema I e retorna a ele.

FMN (flavina mononucleotídeo): riboflavina-fosfato, coenzima de determinadas enzimas de oxidação-redução.

focalização isoeletrica: método eletroforético de separação de macromoléculas com base no pH isoeletrico.

folha pregueada: a disposição lado a lado de cadeias polipeptídicas unidas por ligações de hidrogênio na conformação β .

footprinting: técnica de identificação da sequência de um ácido nucleico que interage com uma proteína de ligação a RNA ou DNA.

força próton-motriz: o potencial eletroquímico inerente a um gradiente de concentração de H^+ transmembrana; usada na fosforilação oxidativa e na fotofosforilação para impulsionar a síntese de ATP.

forças de van der Waals: forças intermoleculares fracas entre moléculas como resultado de indução de polarização de uma pela outra.

forma replicativa: todas as formas estruturais inteiras de um cromossomo viral que servem como intermediários de replicação distintos.

fórmulas de perspectiva de Haworth: método para representar as estruturas químicas cíclicas, de modo que define a configuração de cada grupo substituinte; comumente usadas na representação de açúcares.

fórmulas de projeção: *Ver* fórmulas de projeção de Fischer.

fórmulas de projeção de Fischer: método de representação de moléculas para mostrar a configuração de grupos ao redor de centros quirais;

também conhecidas como fórmulas de projeção.

forquilha de replicação: a estrutura em formato de Y geralmente encontrada no ponto no qual o DNA está sendo sintetizado.

fosfatases: enzimas que clivam ésteres de fosfato por hidrólise, a adição dos elementos da água.

fosfolipídeo: lipídeo que contém um ou mais grupos fosfato.

fosfoproteínas-fosfatase: *Ver* proteínas-fosfatase.

fosforilação: formação de um derivado fosfatado de uma biomolécula, geralmente por transferência enzimática de um grupo fosforila do ATP.

fosforilação fotossintética: *Ver* fotofosforilação.

fosforilação ligada à respiração: formação de ATP a partir de ADP e P_i , possibilitada pelo fluxo de elétrons por uma série de transportadores ligados à membrana, com um gradiente de prótons como a fonte direta de energia que impulsiona a catálise rotacional pela ATP-sintase.

fosforilação no nível do substrato: fosforilação do ADP e de alguns outros nucleosídeos-5'-difosfato, acoplada à desidrogenação de um substrato orgânico; independente da cadeia de transferência de elétrons.

fosforilação oxidativa: a fosforilação enzimática do ADP a ATP acoplada à transferência de elétrons de um substrato para o oxigênio molecular.

fosforilases: enzimas que catalisam a fosforólise.

fosforólise: rompimento de um composto com o fosfato como grupo de ataque; análogo à hidrólise.

fotofosforilação: a formação enzimática de ATP a partir de ADP acoplada à transferência de elétrons fotodependentes nas células fotossintéticas.

fotofosforilação cíclica: síntese de ATP conduzida pelo fluxo cíclico de elétrons pelo fotossistema I.

fóton: a unidade básica (um quantum) de energia luminosa.

fotorredução: a redução induzida pela luz de um aceptor de elétrons nas células fotossintéticas.

fotorrespiração: consumo de oxigênio nas plantas de zona temperada iluminadas, em grande parte em virtude da oxidação do fosfoglicolato.

fotossíntese: o uso da energia luminosa na produção de carboidratos a partir de dióxido de carbono e um agente redutor, como a água. *Comparar com* fotossíntese oxigênica.

fotossíntese oxigênica: síntese de ATP e NADPH usando energia luminosa nos organismos que usam água como fonte de elétrons, produzindo O_2 .

fotossistema: nas células fotossintéticas, um conjunto funcional de pigmentos que absorvem a luz e seu centro de reação, no qual a

energia de um fóton absorvido é transduzida em uma separação de cargas elétricas.

fototrófico: organismo que pode usar a energia da luz na síntese de seus próprios combustíveis a partir de moléculas simples, como dióxido de carbono, oxigênio e água; diferente de um quimiotrófico.

fração: porção de uma amostra biológica que foi sujeita a um procedimento com a intenção de separar macromoléculas com base em propriedades como solubilidade, carga líquida, massa molecular ou função.

fracionamento: o processo de separação de proteínas ou outros componentes de uma mistura molecular complexa em frações com base em propriedades como solubilidade, carga líquida, massa molecular ou função.

fragmento de restrição: segmento de DNA de dupla-fita produzido pela ação de uma endonuclease de restrição sobre um DNA mais longo.

FRAP (recuperação da fluorescência após fotodescoloração): técnica usada para quantificar a difusão de componentes de membrana (lipídeos ou proteínas) no plano da bicamada.

FRET (transferência de energia por ressonância de fluorescência): técnica que estima a distância entre duas proteínas ou dois domínios de uma proteína pela medida da transferência de energia não radioativa entre cromóforos repórteres quando um domínio ou uma proteína é excitado e a fluorescência emitida pelo outro é quantificada.

furanose: açúcar simples contendo um anel furano de cinco membros.

fusão de genes: a ligação enzimática de um gene, ou parte de um gene, a outro.

G

gametas: células reprodutivas com um conteúdo haploide de genes; espermatozoides ou óvulos.

gangliosídeo: esfingolípido que contém oligossacarídeos complexos como cabeça polar; particularmente comum no tecido nervoso.

GAP: *Ver* proteínas ativadoras de GTPase (GAP).

GEF: *Ver* fatores de troca de nucleotídeos de guanosina (GEF).

gene: segmento cromossômico que codifica uma cadeia polipeptídica única funcional ou uma molécula de RNA.

gene estrutural: gene que codifica uma molécula de proteína ou de RNA; diferente de um gene regulador.

gene regulatório: gene que dá origem a um produto envolvido na regulação da expressão de outro gene; por exemplo, um gene que codifica uma proteína repressora.

genes constitutivos: genes que codificam produtos necessários para a célula a todo o momento (como as enzimas das vias centrais produtoras de energia); expressos em todas as condições.

genes homeóticos: genes que regulam o desenvolvimento do padrão de segmentação do plano corporal da *Drosophila*; são encontrados genes semelhantes na maioria dos vertebrados.

genes supressores de tumor: membro de uma classe de genes que codificam proteínas que normalmente regulam o ciclo celular pela supressão da divisão celular. A mutação de uma cópia do gene normalmente não tem efeito, porém, quando ambas as cópias estão defeituosas, a célula continua a se dividir sem limitação, produzindo um tumor.

genoma: toda a informação genética codificada em uma célula ou vírus.

genômica: ciência dedicada ao estudo dos genomas celulares e dos organismos.

genótipo: a constituição genética de um organismo, diferente das características físicas, ou fenótipo.

GFP: *Ver* proteína fluorescente verde (GFP).

G_i: *Ver* proteína G inibitória (G_i).

glicano: polímero de unidades monossacarídicas unidas por ligações glicosídicas; polissacarídeo.

glicerofosfolípido: lipídeo anfipático com um esqueleto de glicerol; os ácidos graxos estão ligados por ligações éster ao C-1 e C-2 do glicerol, e um álcool polar está unido por uma ligação fosfodiéster ao C-3.

gliceroneogênese: a síntese, nos adipócitos, do glicerol-3-fosfato a partir do piruvato para ser usado na síntese de triacilglicerol.

glicoconjugado: composto que contém um componente carboidrato ligado covalentemente a uma proteína ou lipídeo, formando uma glicoproteína ou um glicolípido.

glicogênese: o processo de conversão de glicose em glicogênio.

glicogênico: capaz de ser convertido em glicose ou glicogênio pelo processo de gliconeogênese.

glicogenina: a proteína que inicia a síntese de novas cadeias de glicogênio e catalisa a polimerização dos primeiros poucos resíduos de açúcar de cada cadeia até que a glicogênio-síntase continue com o alongamento da cadeia.

glicogenólise: a degradação enzimática do glicogênio armazenado (não proveniente da dieta).

glicolípido: lipídeo que contém um grupo carboidrato.

glicólise: a via catabólica pela qual uma molécula de glicose é quebrada em duas moléculas de piruvato. *Comparar com* glicólise aeróbica.

glicólise aeróbica: via de quebra da glicose com geração de energia celular (produzindo piruvato, sem sua posterior oxidação), embora o oxigênio esteja disponível. *Ver* glicólise.

glicoma: o complemento completo de carboidratos e moléculas que contêm carboidratos em uma célula ou tecido sob um conjunto particular de condições.

glicômica: a caracterização sistemática do glicoma.

gliconeogênese: a biossíntese de carboidratos a partir de precursores mais simples, não glicídicos, como oxalacetato ou piruvato.

glicoproteína: proteína que contém um grupo carboidrato.

glicosaminoglicano: heteropolissacarídeo com duas unidades alternadas: uma é *N*-acetilglicosamina ou *N*-acetilgalactosamina; a outra é um ácido urônico (geralmente ácido glicurônico). Anteriormente chamado de mucopolissacarídeo.

glicosfingolípido: lipídeo anfipático com um esqueleto de esfingosina, ao qual estão ligados um ácido graxo de cadeia longa e um álcool polar.

glioxissomo: peroxissomo especializado que contém as enzimas do ciclo do glioxilato; encontrado nas células das sementes em germinação.

glipicano: um proteoglicano do tipo heparan sulfato, ancorado a uma membrana por meio de um glicosil-fosfatidilinositol (GPI).

GLUT: designação de uma família de proteínas de membrana que transportam glicose.

gradiente eletroquímico: a soma dos gradientes de concentração e de carga elétrica de um íon através de uma membrana; a força que impulsiona a fosforilação oxidativa e a fotofosforilação.

gráfico do duplo-recíproco: gráfico de $1/V_0$ versus $1/[S]$, que permite uma determinação mais acurada de V_{\max} e K_m do que o gráfico de V_0 versus $[S]$; também chamado de gráfico de Lineweaver-Burk.

grupo: estrutura secundária de RNA ou DNA de fita simples, na qual as partes complementares das repetições palindrômicas se dobram para trás e pareiam, formando uma dupla-hélice antiparalela fechada em uma das extremidades.

grana: pilhas de tilacoides, sacos membranosos achatados ou discos nos cloroplastos.

GRK: *Ver* cinases de receptores acoplados a proteína G (GRK).

gRNA: *Ver* RNA-guia (gRNA).

grupo de saída: o grupo molecular que é deslocado ou que sai em uma reação de eliminação unimolecular ou de substituição bimolecular.

grupo funcional: átomo ou grupo de átomos específico que confere uma propriedade química particular a uma biomolécula.

grupo prostético: íon metálico ou um composto orgânico (que não seja aminoácido) ligado covalentemente a uma proteína e essencial para sua atividade.

grupos R: (1) De modo formal, abreviatura que designa qualquer grupo alquila. (2) Ocasionalmente utilizada em sentido mais geral para denotar praticamente qualquer substituinte orgânico (p. ex., os grupos R dos aminoácidos).

G_s: *Ver* proteína G estimuladora (G_s).

h

haploide: que tem um único conjunto de informação genética; descreve uma célula com um cromossomo de cada tipo. *Comparar com* diploide.

haplótipo: combinação de alelos de genes diferentes que tendem a ser herdados juntos por estarem localizados suficientemente próximos em um cromossomo.

hapteno: molécula pequena que induz uma resposta imune quando ligada a uma molécula maior.

helicases: enzimas que catalisam a separação das fitas de uma molécula de DNA antes da replicação.

α -hélice: conformação helicoidal de uma cadeia polipeptídica, geralmente para a direita, com o maior número possível de ligações de hidrogênio intracadeia; uma das estruturas secundárias mais comuns nas proteínas.

heme: o grupo prostético ferro-porfirina das hemoproteínas.

hemeproteína: proteína que contém um heme como grupo prostético.

hemoglobina: hemeproteína dos eritrócitos; atua no transporte de oxigênio.

heparan-sulfato: polímero sulfatado de *N*-acetilglicosamina e um ácido urônico (ácido glucurônico ou ácido idurônico) alternados; normalmente encontrado na matriz extracelular.

hepatócito: o principal tipo celular do tecido hepático.

heterocromatina: regiões condensadas dos cromossomos, nas quais a expressão gênica geralmente está suprimida. *Comparar com* eucromatina.

heteropolissacarídeo: polissacarídeo que contém mais de um tipo de açúcar.

heterotrófico: descreve um modulador alostérico distinto do ligante (ou substrato) normal.

heterótrofo: organismo que requer moléculas complexas de nutrientes, como a glicose, como fonte de carbono e energia.

hexose: açúcar simples com um esqueleto de seis átomos de carbono.

hidrofílico: polar ou carregado; descreve moléculas ou grupos que se associam à água (dissolvem-se facilmente nela).

hidrofóbico: apolar; descreve moléculas ou grupos insolúveis em água.

hidrolases: enzimas (p. ex., proteases, lipases, fosfatases, nucleases) que catalisam reações de hidrólise.

hidrólise: quebra de uma ligação (p. ex., do tipo anidrido ou uma ligação peptídica) pela adição dos elementos da água, resultando em dois ou mais produtos.

hipoxia: a condição metabólica na qual o suprimento de oxigênio é muito limitado.

histonas: a família de proteínas de caráter básico que se associam firmemente ao DNA nos cromossomos de todas as células eucarióticas.

holoenzima: enzima cataliticamente ativa, que compreende todas as subunidades necessárias, grupos prostéticos e cofatores.

homeobox: uma sequência conservada de DNA de 180 pares de bases, que codifica um domínio proteico encontrado em muitas proteínas com papel regulador no desenvolvimento.

homeodomínio: o domínio proteico codificado pela homeobox; uma unidade de regulação que determina a segmentação do plano corporal.

homeostasia: a manutenção de um estado estacionário dinâmico por mecanismos de regulação que compensam alterações nas condições externas.

homólogos: genes ou proteínas que possuem uma relação clara de sequência e função entre eles.

homopolissacarídeo: um polissacarídeo constituído por um único tipo de unidade monossacarídica.

homotrófico: descreve um modulador alostérico idêntico ao ligante normal.

hormônio: substância química sintetizada em pequena quantidade por um tecido endócrino, a qual é transportada no sangue para outro tecido (ou difunde em parte para células próximas), onde atua como um mensageiro na regulação da função do tecido ou do órgão-alvo.

hormônio trófico (trofina): hormônio peptídico que estimula uma glândula-alvo específica a secretar seu hormônio; por exemplo, a tireotrofina produzida pela hipófise estimula a secreção de tiroxina pela tireoide.

HPLC: *Ver* cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

HRE: elemento de resposta a hormônios (HRE).

i

imunoblot: técnica que utiliza anticorpos para detectar a presença de uma proteína em uma amostra biológica depois que as proteínas da amostra são separadas por eletroforese em gel, transferidas para uma membrana e imobilizadas: também chamada de *Western blot*.

imunoglobulina: anticorpo proteico gerado contra um antígeno e capaz de se ligar especificamente a ele.

***in situ*:** “na posição”, isto é, em sua posição ou localização natural.

***in vitro*:** “no vidro”, isto é, no tubo de ensaio.

***in vivo*:** “na vida”, isto é, na célula ou no organismo vivo.

inativador suicida: molécula relativamente inerte que é transformada por uma enzima, no seu sítio ativo, em uma substância reativa que inativa irreversivelmente a enzima.

índice de hidropatia: escala que expressa as tendências relativas de hidrofobicidade e hidrofiliabilidade de um grupo químico.

índice de massa corporal (IMC): uma medida de obesidade, calculada como a massa em quilogramas dividida pela altura (em metros)². Um IMC maior que 27,5 é considerado como

sobrepeso; quando maior que 30, como obesidade.

indução: aumento na expressão de um gene em resposta a uma alteração na atividade da proteína de regulação.

indutor: molécula sinalizadora que, quando ligada a uma proteína de regulação, produz um aumento na expressão de um dado gene.

inibição competitiva: tipo de inibição enzimática revertida pelo aumento da concentração do substrato; um inibidor competitivo geralmente compete com o substrato normal ou com o ligante por um sítio de ligação na proteína.

inibição incompetitiva: o padrão de inibição reversível que resulta da ligação de uma molécula do inibidor ao complexo enzima-substrato, mas não à enzima livre.

inibição mista: o padrão de inibição reversível que resulta quando uma molécula do inibidor se liga tanto à enzima livre como ao complexo enzima-substrato (não necessariamente com a mesma afinidade).

inibição pelo produto final: *Ver* inibição por retroalimentação.

inibição por retroalimentação: inibição de uma enzima alostérica no início de uma sequência metabólica pelo produto final da sequência; também conhecida como inibição pelo produto final.

inibição reversível: inibição por uma molécula que se liga reversivelmente à enzima, de forma que a atividade enzimática é restituída quando o inibidor não está mais presente.

iniciador: na replicação do DNA, é a síntese de um oligonucleotídeo curto ao qual as DNA-polimerases podem adicionar nucleotídeos.

iniciador (*primer*): oligômero curto (p. ex., de açúcares ou nucleotídeos) ao qual uma enzima adiciona subunidades monoméricas adicionais.

integrina: membro de uma grande família de proteínas heterodiméricas transmembrana, que medeiam a adesão das células entre si ou com a matriz extracelular.

intercalação: inserção entre anéis aromáticos ou planares empilhados; por exemplo, a inserção de uma molécula planar entre duas bases sucessivas de um ácido nucleico.

intermediário de Holliday: intermediário na recombinação genética, na qual duas moléculas de DNA dupla-fita são reunidas por uma permutação recíproca que envolve uma fita de cada molécula.

intermediário de reação: qualquer espécie química em uma via de reação que tem um tempo finito de existência.

intron: sequência de nucleotídeos em um gene que é transcrita, mas removida antes da tradução do gene; também chamada de sequência interveniente. *Ver também* éxon.

íon carbônio: *Ver* carbocátion.

íon hidrônio: o íon hidrogênio hidratado (H_3O^+).

ionóforo: composto que liga um ou mais íons metálicos e é capaz de se difundir através de uma membrana, transportando o íon.

ionotrópico: descreve um receptor de membrana que atua como um canal iônico ativado por ligante. *Comparar com metabotrópico.*

isoenzimas: *Ver* isozimas.

isomerases: enzimas que catalisam a transformação de compostos nos seus isômeros de posição.

isômeros: duas moléculas quaisquer com a mesma fórmula molecular, mas com diferente organização de grupos moleculares.

isômeros *cis* e *trans*: *Ver* isômeros geométricos.

isômeros geométricos: isômeros relacionados por rotação em torno de uma ligação dupla; também chamados de isômeros *cis* e *trans*.

isopreno: o hidrocarboneto 2-metil-1,3-butadieno, unidade estrutural recorrente dos terpenoides.

isoprenoide: componente de um grande número de produtos naturais sintetizados por polimerização enzimática de duas ou mais unidades de isopreno; também chamado de terpenoide.

isótopo radioativo: forma isotópica de um elemento com um núcleo instável que se estabiliza pela emissão de radiação ionizante.

isozimas: formas múltiplas de uma enzima que catalisam a mesma reação, mas diferem na sequência de aminoácidos, na afinidade pelo substrato, na V_{\max} e/ou em propriedades de regulação; também chamadas de isoenzimas.

k

K_d : *Ver* constante de dissociação de ácidos.

K_d : *Ver* constante de dissociação (K_d).

K_{eq} : *Ver* constante de equilíbrio (K_{eq}).

K_m : *Ver* constante de Michaelis (K_m).

K_t ($K_{transporte}$): um parâmetro cinético para um transportador de membrana análogo da constante de Michaelis, K_m , de uma reação enzimática. A taxa de captação do substrato é a metade da máxima quando a concentração do substrato for igual a K_t .

K_w : *Ver* produto iônico da água (K_w).

l

lançadeira da carnitina: mecanismo para deslocar os ácidos graxos do citosol para a matriz mitocondrial como ésteres-graxos de carnitina.

lectina: proteína que se liga a carboidratos, geralmente a oligossacarídeos, com afinidade e especificidade muito altas, responsável por mediar interações célula a célula.

lei de ação das massas: a lei que diz que a velocidade de uma dada reação química é proporcional ao produto das atividades (ou concentrações) dos reagentes.

leucócito: célula branca do sangue; envolvida na resposta imune nos mamíferos.

leucotrieno: membro de uma classe de lipídeos de sinalização não cíclicos eicosanoides com três ligações duplas conjugadas; medeiam respostas inflamatórias, incluindo a atividade da musculatura lisa.

liases: enzimas que catalisam a remoção de um grupo de uma molécula para formar uma

ligação dupla, ou a adição de um grupo a uma ligação dupla.

líder: sequência curta, próxima à extremidade amina de uma proteína ou à extremidade 5' de um RNA, com função de regulação ou de endereçamento.

ligação covalente: ligação química que envolve o compartilhamento dos pares de elétrons.

ligação de hidrogênio: fraca atração eletrostática entre um átomo bastante eletronegativo (como oxigênio ou nitrogênio) e um átomo de hidrogênio ligado covalentemente a um segundo átomo bastante eletronegativo.

ligação dissulfeto: ligação covalente que envolve a união oxidativa de dois resíduos de Cys, de uma mesma ou de diferentes cadeias polipeptídicas, com a formação de um resíduo de cistina.

ligação fosfodiéster: arranjo químico que contém dois álcoois esterificados a uma molécula de ácido fosfórico, a qual serve de ponte entre eles.

ligação peptídica: ligação amida substituída entre um grupo α -amina de um aminoácido e o grupo α -carboxila de outro, com eliminação dos elementos da água.

ligações glicosídicas: *Ver* ligações O-glicosídicas.

ligações O-glicosídicas: ligações entre um açúcar e outra molécula (geralmente álcool, purina, pirimidina ou açúcar) por meio de um oxigênio.

ligante: pequena molécula que interage especificamente com uma maior; por exemplo, um hormônio é um ligante de seu receptor proteico específico.

ligases: enzimas que catalisam reações de condensação nas quais dois átomos são unidos usando a energia do ATP ou de outro composto rico em energia.

linfócito B (célula B): um tipo dentro de uma classe de células sanguíneas (linfócitos); responsável pela produção de anticorpos circulantes.

linfócito T (célula T): membro de uma classe de células sanguíneas (linfócitos) de origem tímica, envolvidos nas reações imunes mediadas por células.

linfócitos: subclasse de leucócitos envolvidos na resposta imune. *Ver também* linfócitos B; linfócitos T.

lipases: enzimas que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis.

lipídeo: biomolécula pequena insolúvel em água que geralmente contém ácidos graxos, esteróis ou compostos isoprenoides.

lipídoma: o conjunto total de moléculas contendo lipídeos de uma célula, tecido ou órgão sob um conjunto específico de condições.

lipidômica: a caracterização sistemática do lipídoma.

lipoato (ácido lipoico): vitamina para alguns organismos; um transportador intermediário de átomos de hidrogênio e de grupos acila nas α -cetoácido-desidrogenases.

lipoproteína: agregado de lipídeos e proteínas que serve para transportar lipídeos insolúveis

em água no sangue. O componente proteico é uma apolipoproteína.

lipossomo: vesícula esférica pequena, composta por uma bicamada fosfolipídica, que se forma espontaneamente quando os fosfolipídeos são suspensos em um tampão aquoso.

lipoxina: membro de uma classe de derivados lineares hidroxilados do araquidonato, que atuam como potentes agentes anti-inflamatórios.

lise: destruição de uma membrana plasmática ou (no caso de bactérias) da parede celular, com liberação do conteúdo celular e morte da célula.

lisossomo: uma organela de células eucarióticas; contém muitas enzimas hidrolíticas e serve como centro de degradação e reciclagem para compostos celulares não necessários.

m

macromolécula: molécula que tem massa molecular na faixa de alguns milhares a muitos milhões.

macromoléculas informacionais: biomoléculas que contêm informação na forma de sequências específicas de diferentes monômeros; por exemplo, muitas proteínas, lipídeos, polissacarídeos e ácidos nucleicos.

malpareamento: um erro de pareamento em um ácido nucleico que impossibilita a formação de um par de bases normal de Watson-Crick.

mapa genético: diagrama que mostra a sequência relativa e a posição de genes específicos ao longo de um cromossomo.

marcador de epítipo: sequência proteica ou um domínio ao qual se liga algum anticorpo bem caracterizado.

matriz: o espaço delimitado pela membrana interna da mitocôndria.

matriz extracelular (MEC): combinação entrelaçada de glicosaminoglicanos, proteoglicanos e proteínas, do lado de fora da membrana plasmática, que proporciona ancoragem celular, reconhecimento posicional e tração durante a migração celular.

MEC: *Ver* matriz extracelular (MEC).

mediador especializado na pró-resolução (SPM): um dos diversos eicosanoides derivados de ácidos graxos essenciais que promove a fase de resolução da resposta inflamatória.

meia-vida: o tempo necessário para o desaparecimento ou decaimento de metade de um dado componente em um sistema.

meiose: tipo de divisão celular, na qual as células diploides originam células haploides destinadas a se tornarem gametas ou esporos.

membrana plasmática: a membrana externa que envolve o citoplasma de uma célula.

metabolismo: o conjunto completo de transformações catalisadas por enzimas das moléculas orgânicas nas células vivas; a soma de anabolismo e catabolismo.

metabolismo intermediário: nas células, as reações catalisadas por enzimas que extraem a energia química das moléculas dos nutrientes e a

usam na síntese e na montagem de componentes celulares.

metabolismo secundário: vias que levam a produtos especializados que não são encontrados em todas as células vivas.

metabolismo vetorial: transformações metabólicas em que a localização (e não a composição química) de um substrato muda em relação à membrana plasmática ou à membrana de uma organela; por exemplo, a ação dos transportadores e bombas de prótons na fosforilação oxidativa e na fotofosforilação.

metabólito: intermediário químico nas reações catalisadas por enzimas do metabolismo.

metaboloma: o conjunto completo de metabólitos moleculares pequenos (intermediários metabólicos, sinalizadores, metabólitos secundários) presentes em uma dada célula ou tecido sob condições específicas.

metabolômica: a caracterização sistemática do metaboloma de uma célula ou tecido.

metabolon: agregado supramolecular de enzimas metabólicas sequenciais.

metabotrópico: descreve um receptor de membrana que atua por meio de um segundo mensageiro. *Comparar com* ionotrópico.

metaloproteína: proteína com um íon metálico como seu grupo prostético.

metameria: divisão do corpo em segmentos, como nos insetos.

micela: agregado de moléculas anfipáticas em água, com as porções apolares no interior e as porções polares na superfície externa, expostas à água.

microarranjo de DNA: coleção de sequências de DNA imobilizadas em uma superfície sólida, com as sequências individuais colocadas em arranjos padronizados que podem ser sondados por hibridização.

microelemento: elemento químico necessário para um organismo somente em quantidades-traço.

microRNA (miRNA): classe de moléculas pequenas de RNA (20 a 25 nucleotídeos depois do processamento completo) envolvidas no silenciamento de genes pela inibição da tradução e/ou promoção da degradação de determinados mRNA.

microssomos: vesículas membranosas formadas pela fragmentação do retículo endoplasmático das células eucarióticas; obtidos por centrifugação diferencial.

migração da ramificação: movimento de um ponto de ramificação em um DNA ramificado formado a partir de duas moléculas de DNA com sequências idênticas. *Ver também* intermediário de Holliday.

miócito: célula muscular.

miofibrila: unidade de filamentos grossos e finos das fibras musculares.

miosina: proteína contrátil; o componente principal dos filamentos grossos do músculo e de outros sistemas actina-miosina.

miRNA: *Ver* microRNA (miRNA).

mistura racêmica: mistura equimolar dos estereoisômeros D e L de um composto opticamente ativo.

mitocôndria: organela das células eucarióticas; contém os sistemas enzimáticos necessários para ciclo do ácido cítrico, oxidação dos ácidos graxos, transferência de elétrons e fosforilação oxidativa.

mitose: nas células eucarióticas, o processo com múltiplas etapas que resulta na replicação dos cromossomos e na divisão celular.

modelo do mosaico fluido: modelo que descreve as membranas biológicas como uma bicamada lipídica fluida com proteínas embebidas; a bicamada exibe assimetria estrutural e funcional.

modificação pós-traducional: o processamento enzimático de uma cadeia polipeptídica após sua tradução a partir do mRNA.

modulador: metabólito que, quando ligado ao sítio alostérico de uma enzima, altera suas características cinéticas.

mol: refere-se a $6,022 \times 10^{23}$ moléculas, átomos ou íons de uma substância. *Ver também* número de Avogadro.

molde: padrão ou molde macromolecular para a síntese de uma macromolécula informacional.

molécula pró-quiral: molécula simétrica que pode reagir assimetricamente com uma enzima que tenha um sítio ativo assimétrico, com a geração de um produto quiral.

monossacarídeo: carboidrato que consiste em uma única unidade de açúcar.

motivo: qualquer padrão de enovelamento distinto para elementos da estrutura secundária, observado em uma ou mais proteínas. Um motivo pode ser simples ou complexo e pode representar toda ou apenas uma parte da cadeia polipeptídica. Também chamado de domínio ou estrutura supersecundária.

motivo de reconhecimento de RNA (RRM): um motivo de ligação ao DNA ou RNA consistindo de uma folha β composta por quatro fitas antiparalelas com duas α -hélices em uma das faces.

mRNA: *Ver* RNA mensageiro (mRNA).

mRNA monocitrônico: um mRNA que é traduzido em apenas uma proteína.

mRNA policitrônico: mRNA contíguo com mais de dois genes que podem ser traduzidos em proteínas.

mTORC1 (alvo mecanístico do complexo 1 da rapamicina): um complexo multiproteico de mTOR (alvo mecanístico da rapamicina) e diversas subunidades reguladoras, que, juntos, atuam como uma proteína-cinase Ser/Thr; estimulado por nutrientes e condições de suficiência energética, dispara crescimento e proliferação celular.

mucopolissacarídeo: *Ver* glicosaminoglicano.

mudança de fase (módulo) de leitura de tradução: mudança programada no módulo de leitura durante a tradução de um mRNA em um ribossomo, ocorrendo em função de diversos possíveis mecanismos.

múltiplos sítios de clonagem (polylinker): curto fragmento de DNA, muitas vezes sintético, que contém sequências de reconhecimento para diversas endonucleases de restrição.

mutação: mudança hereditária na sequência nucleotídica de um cromossomo.

mutação com alteração na fase de leitura: uma mutação causada por inserção ou deleção de um ou mais pares de nucleotídeos que leva à alteração na fase de leitura dos códons durante a síntese proteica; o polipeptídeo produzido apresentará uma sequência de aminoácidos distorcida a partir do códon que sofreu mutação.

mutação letal: mutação que inativa uma função biológica essencial para a vida da célula ou do organismo.

mutação por deleção: mutação que resulta da deleção de um ou mais nucleotídeos de um gene ou de um cromossomo.

mutação por inserção: mutação causada pela inserção de uma ou mais bases extras, ou um mutagênico, entre bases sucessivas no DNA.

mutação por substituição: mutação causada pela substituição de uma base por outra.

mutação sem sentido: mutação que resulta na terminação prematura de uma cadeia polipeptídica.

mutação silenciosa: mutação gênica que não causa alteração detectável nas características biológicas do produto do gene.

mutação supressora: mutação em um sítio distinto de uma mutação primária que restaura total ou parcialmente uma função que fora perdida pela mutação primária.

mutagênese sítio-dirigida: conjunto de métodos usado para criar alterações específicas na sequência de um gene.

mutante auxotrófico (auxótrofo): um organismo mutante que apresenta deficiência na síntese de determinada molécula, a qual deve ser fornecida para o crescimento do organismo.

mutante parcial: gene mutante que origina um produto com um nível detectável de atividade biológica.

mutarrotação: a mudança na rotação específica de um açúcar na forma de piranose ou furanose ou de um glicosídeo que acompanha o equilíbrio de suas formas anoméricas α e β .

mutases: enzimas que catalisam a transposição de grupos funcionais.

N

Na^+/K^+ -ATPase: transportador eletrogênico na membrana plasmática da maioria das células animais que usa a energia do ATP para bombear para fora três Na^+ a cada dois K^+ que são movidos para o interior da célula.

NAD, NADP (nicotinamida-adenina dinucleotídeo-fosfato): coenzimas que contêm nicotinamida que funcionam como transportadores de átomos de hidrogênio e elétrons em algumas reações de oxidação-redução.

ncRNA (RNA não codificante): qualquer RNA que não codifica instruções para um produto proteico.

neurônio: célula do tecido nervoso especializada na transmissão do impulso nervoso.

neurotransmissor: composto de baixa massa molecular (geralmente contendo nitrogênio), secretado pelo terminal axonal de um neurônio que se liga a um receptor específico no próximo neurônio ou em um miócito ou célula glandular; envolvido na transmissão do impulso nervoso.

NHEJ: *Ver* junção de extremidades não homólogas (NHEJ).

nomenclatura de Cleland: notação abreviada desenvolvida por W. W. Cleland para descrever o progresso de reações enzimáticas com múltiplos substratos e produtos.

nucleases: enzimas que hidrolisam as ligações internucleotídicas (fosfodiéster) dos ácidos nucleicos.

núcleo: nos eucariotos, uma organela que contém os cromossomos.

núcleo arqueado: grupo de neurônios no hipotálamo que atua na regulação da fome e do comportamento alimentar.

nucleófilo: grupo rico em elétrons com forte tendência a doá-los para um núcleo deficiente em elétrons (eletrófilo); o reagente que entra em uma reação biomolecular de substituição.

nucleoide: nas bactérias, a zona nuclear que contém o cromossomo, mas não é circundada por membrana.

nucleolo: nas células eucarióticas, estrutura densamente corada no núcleo; envolvida na síntese de rRNA e na formação dos ribossomos.

nucleoplasma: a fração do conteúdo celular eucariótico envolta pela membrana nuclear.

nucleosídeo: composto que consiste em uma base de purina ou pirimidina unida covalentemente a uma pentose.

nucleosídeo-difosfato-cinase: enzima que catalisa a transferência do fosfato terminal de um nucleosídeo-5'-trifosfato para um nucleosídeo-5'-difosfato.

nucleosídeo-monofosfato-cinase: enzima que catalisa a transferência do fosfato terminal do ATP para um nucleosídeo-5'-monofosfato.

nucleossomo: nos eucariotos, unidade estrutural de empacotamento de cromatina; consiste em uma fita de DNA enrolada ao redor de um núcleo de histonas.

nucleotídeo: nucleosídeo fosforilado em um dos grupos hidroxila de sua pentose.

nucleotídeo de piridina: coenzima nucleotídica que contém o derivado de piridina, nicotinamida; NAD ou NADP.

nucleotídeos de flavina: coenzimas nucleotídicas (FMN e FAD) que contêm riboflavina.

número de Avogrado (N): o número de moléculas em um mol de um composto ($6,02 \times 10^{23}$).

número de ligação: o número de vezes que uma fita de DNA circular fechada é enrolada sobre outra; o número de conexões que mantêm os círculos unidos.

número de renovação: o número de vezes que uma molécula de enzima transforma uma molécula de substrato na unidade de tempo sob condições que proporcionam atividade máxima em concentração de saturação de substrato.

O

oligômero: polímero curto, geralmente contendo unidades de aminoácidos, açúcares ou nucleotídeos; a definição de “curto” é um tanto arbitrária, mas geralmente menos de 50 unidades.

oligonucleotídeo: polímero curto de nucleotídeos (geralmente menos de 50).

oligopeptídeo: polímero curto de aminoácidos unidos por ligações peptídicas.

oligosacarídeo: várias oses unidas por ligações glicosídicas.

oncogene: gene causador de câncer; qualquer um dos vários genes mutantes que provocam proliferação rápida e descontrolada nas células. *Ver também* proto-oncogene.

operador: região do DNA que interage com uma proteína repressora no controle da expressão de um gene ou de um grupo de genes.

óperon: unidade de expressão gênica que consiste em um ou mais genes relacionados e as sequências do promotor e do operador que regula sua expressão.

opsina: a porção proteica do pigmento visual que, com a adição do cromóforo retinal, torna-se rodopsina.

orexigênico: que tende a aumentar o apetite e o consumo de alimento. *Comparar com* anorexigênico.

ORF: *Ver* fase de leitura aberta (ORF).

organelas: estruturas delimitadas por membranas encontradas nas células eucarióticas; contêm enzimas e outros componentes necessários para as funções especializadas da célula.

origem: o sítio ou a sequência nucleotídica no DNA onde se inicia a replicação.

ortólogos: genes ou proteínas de espécies diferentes que possuem uma relação clara de sequência e de função entre si.

oscilação: o pareamento de bases relativamente frouxo entre a base da extremidade 3' de um códon e a base complementar na extremidade 5' do anticódon.

osmose: grande fluxo de água através de uma membrana semipermeável para outro compartimento aquoso que contém soluto em uma concentração mais alta.

oxidação: a perda de elétrons por um composto.

α -oxidação: via alternativa de oxidação dos ácidos graxos com uma β -metila nos peroxissomos.

β -oxidação: degradação oxidativa de ácidos graxos a acetil-CoA por oxidações sucessivas no átomo de carbono β ; diferente da α -oxidação.

ω -oxidação: maneira alternativa de oxidação dos ácidos graxos, na qual a oxidação inicial ocorre no carbono mais distante da carboxila; diferente da β -oxidação.

oxidases: enzimas que catalisam reações de oxidação nas quais o oxigênio molecular serve como aceptor de elétrons, mas nenhum dos átomos de oxigênio é incorporado no produto. *Comparar com* oxigenases.

oxidases de função mista: enzimas que catalisam reações nas quais dois substratos diferentes são oxidados simultaneamente pelo oxigênio molecular, mas os átomos do oxigênio não aparecem no produto oxidado.

oxigenases: enzimas que catalisam reações nas quais os átomos de oxigênio são diretamente incorporados no produto, formando um grupo hidroxila ou carboxila. Nas reações catalisadas pelas monoxigenases, somente um dos dois átomos de oxigênio é incorporado; o outro é reduzido a água. Nas reações catalisadas por dioxigenases, ambos os átomos de oxigênio são incorporados ao produto. *Comparar com* oxidases.

oxigenases de função mista: enzimas (p. ex., uma monoxigenase) que catalisam reações nas quais dois redutores – um deles geralmente o NADPH, o outro sendo o substrato da enzima – são oxidados pelo oxigênio molecular, com um átomo de oxigênio incorporado no produto e o outro reduzido a H_2O ; muitas vezes usam o citocromo P-450 para transportar elétrons do NADPH para o O_2 . As oxigenases, diferentemente das oxidases, promovem reações nas quais pelos menos um dos átomos de oxigênio é incorporado no produto final.

P

palíndromo: segmento de DNA dúplice, no qual as sequências de bases das duas fitas exibem simetria rotacional dupla sobre um eixo.

par acidobase conjugado: doador de prótons e sua espécie desprotonada correspondente; por exemplo, ácido acético (doador) e acetato (aceptor).

par conjugado redox: doador de elétrons e sua forma aceptor de elétrons correspondente; por exemplo, Cu^+ (doador) e Cu^{2+} (aceptor), ou NADH (doador) e NAD^+ (aceptor).

par de bases: dois nucleotídeos nas cadeias de ácidos nucleicos que pareiam por ligações de hidrogênio de suas bases; por exemplo, A com T ou U, e G com C.

par redox: um doador de elétrons e sua forma oxidada correspondente; por exemplo, NADH e NAD^+ .

paradigma: em bioquímica, um modelo ou exemplo experimental.

parálogos: genes ou proteínas presentes em uma mesma espécie que possuem uma relação clara de sequência e função entre eles.

patogênico: causador de doenças.

PCR: *Ver* reação em cadeia da polimerase (PCR).

PCR quantitativa: um procedimento usando PCR que permite a determinação do grau em que um molde amplificado estava na amostra original; também chamada de PCR em tempo real.

PDB (Protein Data Bank, ou Banco de Dados de Proteínas): banco de dados internacional (www.pdb.org) que armazena os dados que descrevem a estrutura tridimensional de praticamente todas as macromoléculas cujas estruturas já tenham sido publicadas.

pentose: açúcar simples que contém um esqueleto com cinco átomos de carbono.

peptidases: enzimas que hidrolisam ligações peptídicas.

peptídeo: dois ou mais aminoácidos unidos covalentemente por ligações peptídicas.

peptidil-transferase: a atividade enzimática que sintetiza as ligações peptídicas das proteínas; uma ribozima, parte do rRNA da subunidade ribossômica grande.

peptideoglicano: o componente principal da parede celular bacteriana; geralmente consiste em heteropolissacarídeos paralelos unidos transversalmente por peptídeos curtos.

perfil ribossômico: técnica empregando sequenciamento de DNA de nova geração para fragmentos de cDNA derivados de RNA ligado a ribossomos celulares, para determinar quais mRNA estão sendo traduzidos em um dado momento.

permeases: Ver transportadores.

peroxissomo: organela das células eucarióticas; contém enzimas de formação e degradação de peróxidos.

peso molecular grama: de um composto, é o peso em gramas numericamente igual à sua massa molecular; a massa de um mol.

pH: o antilogaritmo da concentração dos íons hidrogênio em uma solução aquosa.

pH isoeletrico (ponto isoeletrico, pI): o pH no qual o soluto não tem carga elétrica líquida e por isso não se move em um campo elétrico.

pH ótimo: o pH característico no qual uma enzima tem atividade catalítica máxima.

pI: Ver pH isoeletrico (ponto isoeletrico, pI).

pigmentos acessórios: pigmentos que absorvem a luz visível (carotenoides, xantofilas e ficobilinas) em plantas e bactérias fotossintéticas que complementam a clorofila na captura da energia da luz solar.

piranose: um açúcar simples, contendo o anel pirano de seis membros.

piridoxal-fosfato (PLP): coenzima que contém a vitamina piridoxina (vitamina B₆); atua em reações que envolvem transferência de grupos amina.

pirimidina: base nitrogenada heterocíclica encontrada em nucleotídeos e ácidos nucleicos.

pirofosfatase: Ver pirofosfatase inorgânica.

pirofosfatase inorgânica: enzima que hidrolisa uma molécula de pirofosfato inorgânico com a

formação de duas moléculas de (orto)fosfato; também conhecida como pirofosfatase.

pirossequeciamento: tecnologia de sequenciamento de DNA, na qual a adição de cada nucleotídeo pela DNA-polimerase dispara uma série de reações que terminam em um *flash* luminoso, gerado pela luciferase.

pK_a: o antilogaritmo de uma constante de equilíbrio.

plantas C₄: plantas (geralmente tropicais) nas quais o CO₂ é inicialmente fixado em um composto de quatro carbonos (oxalacetato ou malato) antes de ingressar no ciclo de Calvin através da reação da rubisco.

plantas CAM: Plantas suculentas de clima quente e seco, nas quais o CO₂ é fixado, produzindo oxalacetato no escuro, sendo, então, fixado pela rubisco na presença da luz quando os estômatos se fecham para excluir o O₂.

plaquetas: células pequenas, anucleadas, que iniciam a coagulação sanguínea; originam-se de células da medula óssea denominadas megacariócitos. Também conhecidas como trombócitos.

plasmalogênio: fosfolipídeo com substituinte alqueno-éter no C-1 do glicerol.

plasmídeo: pequena molécula de DNA circular, extracromossômico e de replicação independente, comumente utilizada em engenharia genética.

plastídeo: em plantas, uma organela autorreplicativa; pode se diferenciar em um cloroplasto ou amiloplasto.

plectonêmica: a estrutura de um polímero molecular que tem um entrelaçamento de fitas umas sobre as outras de uma maneira regular e simples.

PLP: Ver piridoxal-fosfato (PLP).

polar: hidrofílico ou “que gosta de água”; descreve moléculas ou grupos que são solúveis em água.

polaridade: (1) em química, a distribuição não uniforme dos elétrons em uma molécula; as moléculas polares geralmente são solúveis em água. (2) Em biologia molecular, a distinção entre as extremidades 3' e 5' dos ácidos nucleicos.

polimórfica: descreve uma proteína para a qual existem sequências variantes de aminoácidos em uma população de organismos, mas as variações não destroem a função de proteína.

polimorfismo de nucleotídeo único (SNP): mudança genômica de um par de bases que ajuda a distinguir uma espécie de outra ou um subgrupo de indivíduos em uma população.

polimorfismos de sequência: qualquer alteração na sequência genômica (mudanças de pares de bases, inserções, deleções, rearranjos) que ajuda a distinguir subgrupos de indivíduos em uma população ou em uma espécie de outra.

polinucleotídeo: sequência de nucleotídeos unidos covalentemente, na qual a hidroxila 3' da pentose de um resíduo de nucleotídeo é unida por uma ligação fosfodiéster à hidroxila 5' da pentose do resíduo seguinte.

polipeptídeo: longa cadeia de aminoácidos unidos por ligações peptídicas; a massa molecular é geralmente menor do que 10.000.

polirribossomo: Ver polissomo.

polissacarídeo: polímero linear ou ramificado de unidades monossacarídicas unidas por ligações glicosídicas.

polissomo: complexo formado por uma molécula de mRNA e dois ou mais ribossomos; também chamado de polirribossomo.

porfíria: condição hereditária resultante da falta de uma ou mais enzimas necessárias para a síntese de porfirinas.

porfirina: compostos nitrogenados complexos que contêm quatro pirróis substituídos unidos covalentemente, formando um anel; com frequência, complexados com um átomo de metal central.

potencial de fosforilação (ΔG_p): a variação real de energia livre de hidrólise do ATP sob as condições não padrão que prevalecem na célula.

potencial de membrana (V_m): a diferença no potencial elétrico através de uma membrana biológica, comumente medido inserindo-se um microeletrodo; valores típicos vão de -25 mV (por convenção, o sinal negativo indica que o lado de dentro é negativo em relação ao lado de fora) a mais de -100 mV através de algumas membranas de vacúolos vegetais.

potencial de redução padrão (E'°): a força eletromotriz exibida em um eletrodo em concentrações 1 M de um agente redutor e sua forma oxidada a 25°C e pH 7,0; uma medida da tendência relativa do agente redutor de perder elétrons.

potencial de transferência de grupo: medida da capacidade de um composto de doar um grupo ativado (como grupo acila ou fosfato); geralmente expresso como energia livre padrão de hidrólise.

potencial eletroquímico: a energia necessária para manter uma separação de carga e de concentração em uma membrana.

potencializadores (estimuladores): sequências de DNA que facilitam a expressão de um dado gene; podem estar localizados a poucas centenas, ou mesmo milhares, de pares de bases do gene.

PPAR (receptores ativados por proliferadores de peroxissomos): uma família de fatores de transcrição nucleares, ativados por ligantes lipídicos, que alteram a expressão de genes específicos, incluindo aqueles que codificam enzimas de síntese ou de degradação lipídica.

prebiótico: ingrediente nutricional não digerível, fermentado seletivamente, que favorece o crescimento de bactérias promotoras da saúde.

preparação (priming): na fosforilação de proteínas, é a fosforilação de um resíduo de aminoácido que se torna o sítio de ligação e o ponto de referência para a fosforilação de outros resíduos na mesma proteína.

pressão osmótica: pressão gerada pelo fluxo osmótico da água através de uma membrana se-

mipermável para um compartimento aquoso que contém soluto em concentração mais alta.

primases: enzimas que catalisam a formação de oligonucleotídeos de RNA usados como iniciadores pelas DNA-polimerases.

primeira lei da termodinâmica: a lei que diz que, em todos os processos, a energia total do universo permanece constante.

primossomo: complexo enzimático que sintetiza os iniciadores necessários para a síntese da fita descontínua do DNA.

probiótico: microrganismo vivo que, quando administrado em quantidades adequadas, confere uma vantagem para a saúde do hospedeiro.

procarioto: termo usado historicamente para se referir a qualquer espécie dos domínios Bacteria e Archaea. As diferenças entre as bactérias (antigamente designadas “eubactérias”) e as arqueobactérias são grandes o suficiente, de modo que esse termo tenha utilidade limitada. É comum, mas enganosa, a tendência de usar “procarioto” ao se referir somente às bactérias; “procarioto” também implica um relacionamento ancestral com os eucariotos, o que é incorreto. Neste texto, não utilizamos “procarioto” e “procariótico”.

processamento pós-transcricional: o processamento enzimático do transcrito primário do RNA para a produção de RNA funcionais, incluindo mRNA, tRNA, rRNA e muitas outras classes de RNA.

processividade: para qualquer enzima que catalisa a síntese de um polímero biológico, é a propriedade de adicionar múltiplas subunidades ao polímero sem se dissociar do substrato.

processo anaeróbico: processo que ocorre na ausência de ar ou oxigênio.

produto iônico da água (K_w): o produto das concentrações de H^+ e OH^- na água pura; $K_w = [H^+][OH^-] = 1 \times 10^{-14}$ a 25°C.

profundidade de sequenciamento: o número de vezes, em média, em que um dado nucleotídeo genômico é incluído em segmentos sequenciados de DNA.

promotor: sequência de DNA à qual a RNA-polimerase pode se ligar, levando ao início da transcrição.

propriedades coligativas: propriedades de uma solução que dependem do número de partículas de soluto por unidade de volume; por exemplo, redução do ponto de congelamento.

prostaglandina: representante de uma classe de lipídeos eicosanoides cíclicos poli-insaturados que atuam como hormônios parácrinos.

proteases: enzimas que catalisam a clivagem hidrolítica de ligações peptídicas nas proteínas.

proteassomo: conjunto supramolecular de complexos enzimáticos que atuam na degradação de proteínas celulares desnecessárias ou danificadas.

proteína: macromolécula composta por uma ou mais cadeias polipeptídicas, cada qual com uma sequência característica de aminoácidos unidos por ligações peptídicas.

proteína alostérica: proteína (geralmente com várias subunidades) com múltiplos sítios de interação com ligantes, de modo que a interação com o ligante em um sítio afeta sua interação em outro.

proteína ancorada por GPI: proteína retida na camada externa da membrana plasmática em ligação covalente por meio de uma cadeia curta de oligossacarídeo a uma molécula de fosfatidilinositol da membrana.

proteína ativadora de genes catabólitos (CAP): *Ver* proteína receptora de cAMP (CRP).

proteína conjugada: proteína que contém um ou mais grupos prostéticos.

proteína de fusão: (1) componente de uma família de proteínas que facilita a fusão de membranas. (2) O produto proteico de um gene criado pela fusão de dois genes distintos ou de partes de genes.

proteína desacopladora 1 (UCP1): proteína da membrana mitocondrial interna do tecido adiposo marrom e do tecido adiposo bege que permite o movimento de prótons transmembrana, fazendo um curto-circuito no uso normal dos prótons para impulsionar a síntese de ATP e dissipando como calor a energia da oxidação dos substratos. Também chamada de termogenina.

proteína desnaturada: proteína que perdeu parte de sua conformação nativa por exposição a um agente desestabilizador, como o calor ou um detergente, o suficiente para perder sua função.

proteína ferro-enxofre: membro de uma grande família de proteínas de transferência de elétrons, na qual o transportador de elétrons é um ou mais íons de ferro associados a dois ou mais átomos de enxofre de resíduos de Cys ou de sulfeto inorgânico.

proteína ferro-enxofre de Rieske: tipo de proteína ferro-enxofre na qual dois dos ligantes ao íon ferro central são cadeias laterais de His; atua em muitas sequências de transferência de elétrons, incluindo fosforilação oxidativa e fotofosforilação.

proteína G estimuladora (G_i): proteína trimérica reguladora que liga GTP e que, quando ativada por um receptor de membrana plasmática associado, estimula uma enzima vizinha na membrana, como a adenilil-ciclase; seus efeitos se opõem aos da G_q .

proteína G inibitória (G_i): proteína trimérica de ligação a GTP que, quando ativada por um receptor associado à membrana plasmática, inibe uma enzima de membrana próxima, como a adenilil-ciclase. *Comparar com* proteína G estimuladora (G_q).

proteína oligomérica: proteína com subunidades, tendo duas ou mais cadeias polipeptídicas.

proteína receptora de cAMP (CRP): proteína reguladora específica das bactérias que controla a iniciação da transcrição dos genes que produzem as enzimas necessárias para que a célula possa usar outros nutrientes quando falta glicose; também chamada de proteína ativadora de genes catabólitos (CAP).

proteína simples: proteína que, quando hidrolisada, produz somente aminoácidos.

proteína verde fluorescente (GFP): pequena proteína de um organismo marinho que produz uma fluorescência brilhante na região verde do espectro visível. A fusão de proteínas com GFP é comumente usada na determinação da localização subcelular da proteína fusionada por microscopia de fluorescência.

proteína-cinase ativada por AMP (AMPK): proteína-cinase ativada por adenosina 5'-monofosfato (AMP). A atividade da AMPK geralmente muda o metabolismo de anabólico para produção de energia (catabólico).

proteínas adaptadoras: proteínas sinalizadoras, geralmente desprovidas de atividade enzimática, com sítios de ligação para dois ou mais componentes celulares e que servem para aproximar esses componentes.

proteínas anfitrópicas: proteínas que se associam reversivelmente à membrana e, portanto, podem ser encontradas no citosol, na membrana ou em ambos.

proteínas ativadoras de GTPase (GAP): proteínas de regulação que se ligam a proteínas G ativadas e estimulam sua atividade GTPásica intrínseca, acelerando sua autoinativação.

proteínas-cinase: enzimas que transferem o grupo fosforila terminal do ATP ou de outro nucleosídeo-trifosfato para a cadeia lateral de uma Ser, Thr, Tyr, Asp ou His em uma proteína-alvo, regulando, dessa forma, a atividade ou outras propriedades da proteína.

proteínas contendo ferro não heme: proteínas que contêm ferro, mas não um grupo porfirina; geralmente envolvidas em reações *redox*.

proteínas de suporte: proteínas não catalíticas que fornecem o arcabouço para a formação de complexos multienzimáticos, provendo dois ou mais sítios de ligação específicos para essas proteínas.

proteínas fibrosas: proteínas insolúveis que têm um papel protetor ou estrutural; contêm cadeias polipeptídicas que, em geral, compartilham uma estrutura secundária comum.

proteínas-fosfatase: enzimas que hidrolisam uma ligação éster ou anidrido de fosfato em uma proteína, liberando fosfato inorgânico, P_i . Também chamadas de fosfoproteínas-fosfatase.

proteínas G: grande família de proteínas de ligação a GTP que atuam nas vias de sinalização intracelular e no tráfego de membranas. São ativas quando ligadas ao GTP e se autoinativam, convertendo GTP em GDP. Também chamadas de proteínas de ligação a nucleotídeos de guanosina.

proteínas G pequenas: *Ver* superfamília Ras das proteínas G.

proteínas G triméricas: membros da família das proteínas G com três subunidades que atuam em uma grande variedade de vias de sinalização. São inativas quando ligadas ao GDP, são ativadas por receptores associados quando GDP é substituído por GTP e inativadas por suas atividades GTPásicas intrínsecas.

proteínas globulares: proteínas solúveis com forma globular (um pouco arredondada).

proteínas homólogas: proteínas com sequências similares que atuam em diferentes espécies; por exemplo, as hemoglobinas.

proteínas integrais: proteínas ligadas firmemente a uma membrana por interações hidrofóbicas; diferente de proteínas periféricas.

proteínas intrinsecamente desorganizadas: proteínas, ou segmentos de proteínas, desprovidas de uma estrutura tridimensional definida em solução.

proteínas periféricas: proteínas ligadas de modo fraco ou reversível a uma membrana por ligações de hidrogênio ou forças eletrostáticas; geralmente solúveis em água depois de liberadas da membrana. *Comparar com* proteínas integrais.

proteínas plasmáticas: as proteínas presentes no plasma sanguíneo.

proteínas que ligam nucleotídeos de guanosina: *Ver* proteínas G.

proteoglicano: macromolécula híbrida que consiste em um heteropolissacarídeo unido a um polipeptídeo; o polissacarídeo é o componente principal.

proteoma: o conjunto completo das proteínas expressas em uma dada célula, ou o conjunto completo das proteínas que podem ser expressas por um dado genoma.

proteômica: em sentido amplo, o estudo do conjunto proteico de uma célula ou de um organismo.

proteostasia: a manutenção em estado estacionário do conjunto de proteínas celulares necessárias para as funções celulares sob um dado conjunto de condições.

protômero: termo geral que descreve qualquer unidade repetida de uma ou mais subunidades proteicas estávelmente associadas em uma estrutura proteica maior. Se o protômero tiver múltiplas subunidades, estas podem ser iguais ou diferentes.

proto-oncogene: gene celular, que geralmente codifica uma proteína de regulação, que pode ser convertido, por mutação, em um oncogene.

purina: uma base nitrogenada heterocíclica, componente dos nucleotídeos e dos ácidos nucleicos; contém anéis pirimidina e imidazol fusionados.

puromicina: antibiótico que inibe a síntese polipeptídica, uma vez que se incorpora a uma cadeia polipeptídica em crescimento, causando sua terminação prematura.

Q

Q: *Ver* razão de ação das massas (Q).

quantum: a unidade fundamental de energia.

quilômicon: lipoproteína plasmática que consiste em uma grande gota de triacilgliceróis, estabilizada por um revestimento de proteínas e

fosfolípidos; transporta lípidos do intestino para os tecidos.

quimera de DNA: DNA que contém informação genética derivada de duas espécies diferentes.

quimiotaxia: percepção celular de um agente químico específico, com movimento da célula no sentido dele ou para longe.

quimiotrófico: organismo que obtém energia pela metabolização de compostos orgânicos derivados de outros organismos.

R

radiação ionizante: tipo de radiação, como os raios X, que causa perda de elétrons de algumas moléculas orgânicas, tornando-as mais reativas.

radiação ultravioleta (UV): radiação eletromagnética na região de 200 a 400 nm.

radical: átomo ou grupo de átomos com um elétron não pareado; também chamado de radical livre.

radical livre: *Ver* radical.

radioimunoensaio (RIE): método quantitativo sensível para a detecção de quantidades-traço de uma biomolécula, com base na sua capacidade de deslocar uma forma radioativa da molécula da sua combinação com seu anticorpo específico.

RAPG: *Ver* receptores acoplados à proteína G (RAPG).

razão das massas (Q): para a reação $aA + bB \rightleftharpoons cC + dD$, a razão $[C]^c[D]^d/[A]^a[B]^b$.

razão P/O: o número de moles de ATP formados na fosforilação oxidativa por $\frac{1}{2}O_2$ reduzido (portanto, por par de elétrons que passam ao O_2). Os valores experimentais usados neste texto são 2,5 para a passagem de elétrons do NADH para o O_2 , e 1,5 para a passagem de elétrons do $FADH_2$ para o O_2 .

reação anaplerótica: reação catalisada por enzima que reabastece de intermediários o ciclo do ácido cítrico.

reação de fixação de carbono: a reação, catalisada pela rubisco durante a fotossíntese ou por outras carboxilases, na qual o CO_2 atmosférico é inicialmente incorporado (fixado) em um composto orgânico.

reação de Hill: a produção de oxigênio e a fotoredução de um aceptor artificial de elétrons por uma preparação de cloroplastos na ausência de dióxido de carbono.

reação de oxidação-redução: reação na qual os elétrons são transferidos de uma molécula doadora para uma aceptora; também chamada de reação *redox*.

reação em cadeia da polimerase (PCR): procedimento de laboratório repetitivo que resulta na amplificação geométrica de uma sequência específica de DNA.

reação endoergônica: reação química que consome energia (i.e., que tem um ΔG positivo).

reação endotérmica: uma reação química que consome calor (i.e., apresenta ΔH positivo).

reação exergônica: reação química que ocorre com liberação de energia livre (i.e., cujo ΔG é negativo).

reação exotérmica: reação química que libera calor (i.e., cujo ΔH é negativo).

reação redox: *Ver* reação de oxidação-redução.

reações acopladas: duas reações químicas que têm um intermediário comum, sendo, dessa forma, uma maneira de transferir energia de uma para a outra.

reações de assimilação de carbono: sequência de reações, na qual o CO_2 atmosférico é convertido em compostos orgânicos.

reações do escuro: *Ver* reações de assimilação de carbono.

reações fotodependentes: as reações da fotossíntese que necessitam de luz e não podem ocorrer no escuro; também conhecidas como reações luminosas.

receptor hormonal: uma proteína, dentro ou na superfície, de células-alvo que se liga a hormônios específicos e inicia a resposta celular.

receptor tirosina-cinase (RTK): grande família de proteínas de membrana plasmática com sítios de interação com ligantes no domínio extracelular, uma única hélice transmembrana e um domínio citoplasmático com atividade de tirosina-cinase controlada pelo ligante extracelular.

receptores acoplados à proteína G (RAPG): grande família de proteínas receptoras de membrana com sete segmentos helicoidais transmembrana, com frequência associadas a proteínas G para transduzir um sinal extracelular em uma mudança no metabolismo celular.

receptores ativados por proliferadores de peroxissomos: *Ver* PPAR (receptores ativados por proliferadores de peroxissomos).

recombinação: qualquer processo enzimático pelo qual o arranjo linear da sequência de nucleotídeos nos ácidos nucleicos em um cromossomo é alterado por clivagem e religação.

recombinação genética homóloga: recombinação entre duas moléculas de DNA de sequências similares que ocorre em todas as células; ocorre nos eucariotos durante a mitose e a meiose.

recombinação sítio-específica: tipo de recombinação genética que ocorre somente em sequências específicas.

recuperação de fluorescência após fotodescoloração: *Ver* FRAP (recuperação de fluorescência após fotodescoloração).

redução: o ganho de elétrons por um composto ou íon.

regra do positivo para dentro: observação geral de que a maioria das proteínas da membrana plasmática estão orientadas de forma que a maioria dos resíduos positivamente carregados (Lys e Arg) se localizam na face citosólica.

regulação metabólica: os mecanismos pelos quais as células resistem a alterações na concentração de metabólitos individuais que, caso contrário, poderiam ocorrer quando os meca-

nismos de controle metabólico alteram o fluxo por uma via.

regulador da sinalização da proteína G: domínio estrutural proteico que estimula a atividade GTPásica das proteínas G heterotriméricas.

regulon: grupo de genes ou óperons regulados de forma coordenada mesmo que alguns, ou todos, estejam espacialmente separados no cromossomo ou no genoma.

renaturação: redobramento de uma proteína globular desdobrada (desnaturada), de modo a restabelecer sua estrutura e sua função nativas.

reparo de malpareamento: sistema enzimático para reparação de malpareamento de bases no DNA.

reparo do DNA por recombinação: processo de recombinação direcionado para o reparo de quebras de fitas ou ligações transversais do DNA, principalmente em forquilhas de replicação inativadas.

repetições curtas em tandem: sequência curta de DNA (geralmente 3 a 6 pb), repetida muitas vezes em tandem com uma localização especial no cromossomo.

replicação: síntese de moléculas-filhas de ácidos nucleicos idênticas ao ácido nucleico parental.

replissomo: o complexo multiproteico que promove a síntese do DNA na forquilha de replicação.

repressão: redução na expressão de um gene em resposta a uma mudança na atividade de uma proteína de regulação.

repressor: a proteína que se liga à sequência regulatória ou ao operador de um gene, bloqueando sua transcrição.

repressor de tradução: repressor que se liga ao mRNA, bloqueando a tradução.

resíduo: unidade individual de um polímero; por exemplo, um aminoácido em uma cadeia polipeptídica. O termo reflete o fato de que os açúcares, os nucleotídeos e os aminoácidos perdem alguns átomos (geralmente os elementos da água) quando incorporados em seus respectivos polímeros.

resíduo aminoterminal: o único resíduo de aminoácido em uma cadeia polipeptídica que tem um grupo α -amino livre; define a extremidade amina (ou N) do polipeptídeo.

resíduo carboxiterminal: o único resíduo de aminoácido em uma cadeia polipeptídica que tem um grupo α -carboxila livre; define a extremidade carboxila (ou C) do polipeptídeo.

resina de troca aniônica: resina polimérica com grupos catiônicos fixados, usada na separação cromatográfica de ânions.

resina de troca catiônica: polímero insolúvel com cargas negativas fixadas, usado na separação cromatográfica de substâncias catiônicas.

respiração: qualquer processo metabólico que conduz à captação de oxigênio e à liberação de CO_2 .

resposta imune: a capacidade de um vertebrado de gerar anticorpos contra um antígeno, uma macromolécula estranha ao organismo.

resposta SOS: nas bactérias, uma indução coordenada de uma grande variedade de genes em resposta a altos níveis de dano ao DNA.

ressonância magnética nuclear (RMN): técnica que utiliza determinadas propriedades da mecânica quântica dos núcleos atômicos no estudo da estrutura e da dinâmica das moléculas das quais fazem parte.

retículo endoplasmático: amplo sistema de membranas duplas no citoplasma de células eucarióticas; inclui canais de secreção e, com frequência, está guarnecido com ribossomos (retículo endoplasmático rugoso).

retinal: aldeído isoprenoide com 20 carbonos derivado do caroteno, que serve como componente fotossensível no pigmento visual rodopsina. A iluminação converte 11-*cis*-retinal em todo-*trans*-retinal.

retroalimentação negativa: regulação de uma via bioquímica na qual o produto da via inibe uma etapa anterior na via.

retrovírus: vírus de RNA que contém transcriptase reversa.

revisão: a correção de erros na síntese de um biopolímero que contém informações, pela remoção das subunidades monoméricas incorretas depois de elas terem sido adicionadas covalentemente ao polímero em crescimento.

RGS: *Ver* regulador da sinalização da proteína G.

ribocomutador: um segmento estruturado de um mRNA que se liga a um ligante específico e afeta a tradução ou o processamento do mRNA.

ribonuclease: nuclease que catalisa a hidrólise de determinadas ligações internucleotídicas no RNA.

ribonucleotídeo: nucleotídeo que contém D-ribose como seu componente de pentose.

ribossomo: complexo supramolecular de rRNA e proteínas, com diâmetro aproximado de 18 a 22 nm; o local da síntese proteica.

ribozimas: moléculas de ácido ribonucleico com atividade catalítica; enzimas de RNA.

ribulose-1,5-bisfosfato-carboxilase/oxigenase (rubisco): enzima que fixa CO_2 na forma orgânica (3-fosfoglicerato) nos organismos (plantas e alguns microrganismos) capazes de fixar CO_2 .

RIE: *Ver* radioimunoensaio (RIE).

RMN: *Ver* ressonância magnética nuclear (RMN).

RNA (ácido ribonucleico): polirribonucleotídeo com sequência específica unido por ligações 3'-5'-fosfodiéster sucessivas.

RNA mensageiro (mRNA): classe de moléculas de RNA, cada uma delas complementar a uma fita de DNA; carregam a mensagem genética dos cromossomos para os ribossomos.

RNA não codificante: *Ver* ncRNA (RNA não codificante).

RNA não codificante longo (lncRNA): um RNA que geralmente apresenta mais de 200 nucleotídeos ligados, que não apresenta um padrão de leitura codificando uma proteína; apresenta funções variadas e numerosas na regulação gênica e na manutenção estrutural da cromatina.

RNA nuclear pequeno (snRNA): uma classe de RNA curtos, geralmente contendo 100 a 200 nucleotídeos de comprimento, presente no núcleo; envolvidos no processo de *splicing* do mRNA eucariótico.

RNA nucleolar pequeno (snoRNA): classe de RNA pequenos, com 60 a 300 nucleotídeos de comprimento, que controlam a modificação dos rRNA no nucléolo.

RNA ribossômico (rRNA): uma classe de moléculas de RNA que atuam como componentes dos ribossomos.

RNA transportador (tRNA): classe de moléculas de RNA (M_r 25.000 a 30.000), em que cada tipo dessas moléculas se combina covalentemente com um determinado aminoácido como primeiro passo na síntese proteica.

RNA-guia (gRNA): RNA encontrado em sistemas CRISPR que tem sequências complementares às de um DNA-alvo, como o DNA de um fago.

RNA-guia único (sgRNA): uma combinação de RNA-guia (gRNA) e crRNA de ativação em *trans* (tracrRNA) que permite que um único RNA ative Cas-nucleases (sobretudo Cas9) e dirija o sistema a determinada sequência de DNA. Partes do RNA podem ser desenhadas por engenharia genética para direcionar o sistema para qualquer sequência de DNA que se queira.

RNA-polimerase: enzima que catalisa a formação de RNA a partir de ribonucleosídeos-5'-trifosfato, usando uma fita de DNA ou de RNA como molde.

rodopsina: o pigmento visual, composto pela proteína opsina e o cromóforo retinal.

rotação específica: a rotação, em graus, do plano da luz polarizada (linha D do sódio) por um composto opticamente ativo a 25°C, com uma trajetória da luz e concentração específicas.

rRNA: *Ver* RNA ribossômico (rRNA).

RTK: *Ver* receptor tirosina-cinase (RTK).

rubisco: *Ver* ribulose-1,5-bisfosfato-carboxilase/oxigenase.

S

S-adenosilmetionina (adoMet): cofator enzimático envolvido na transferência de grupos metila.

sais biliares: derivados esteroides anfipáticos com propriedades detergentes, que participam da digestão e da absorção dos lipídeos.

sarcômero: unidade estrutural e funcional do sistema contrátil do músculo.

segunda lei da termodinâmica: a lei que diz que, em qualquer processo físico ou químico, a entropia do universo tende a aumentar.

segundo mensageiro: molécula efetora sintetizada na célula em resposta a um sinal externo (primeiro mensageiro), como um hormônio.

selectinas: uma grande família de proteínas de membrana que se ligam fortemente e de modo específico a oligossacarídeos sobre outras células e levam sinais através da membrana plasmática.

SELEX: método de identificação experimental rápida de sequências de ácidos nucleicos (geralmente RNA) com propriedades catalíticas particulares ou de interação com ligantes.

sequência-consenso: sequência de DNA ou de aminoácidos que consiste em resíduos que ocorrem mais comumente em cada posição em um grupo de sequências similares.

sequência de inserção: sequências específicas de bases em ambas as extremidades de um segmento de DNA de transposição.

sequência de Shine-Dalgarno: sequência em um mRNA necessária para a ligação dos ribossomos bacterianos.

sequência de terminação: sequência de DNA, na extremidade de uma unidade de transcrição, que sinaliza o final da transcrição.

sequência regulatória: sequência de DNA envolvida na regulação da expressão de um gene; por exemplo, um promotor ou operador.

sequência sinal: sequência de aminoácidos, frequentemente na extremidade amina, que sinaliza o destino na célula ou a localização de uma proteína recém-sintetizada.

sequenciamento de molécula única em tempo real (SMRT): tecnologia de sequenciamento de DNA na qual as adições de nucleotídeos são detectadas como emissão de luz colorida fluorescente, com sensibilidade aumentada, de modo que moléculas longas de DNA (até 15.000 nucleotídeos) podem ser sequenciadas e os resultados mostrados em tempo real.

sequenciamento de Sanger: método de sequenciamento de DNA baseado na utilização de dideoxinucleosídeos trifosfatados, desenvolvido por Frederick Sanger; também chamado de sequenciamento dideoxi.

sequenciamento dideoxi: *Ver* sequenciamento de Sanger.

sequenciamento por semicondutor iônico: tecnologia de sequenciamento de DNA na qual adições de nucleotídeos são detectadas medindo-se os elétrons liberados.

sequenciamento de terminação reversíveis: tecnologia de sequenciamento de DNA na qual adições de nucleotídeos são detectadas e monitoradas pela fluorescência emitida quando é adicionado um nucleotídeo marcado com uma sequência de terminação removível.

sequenciamento SMRT: *Ver* sequenciamento de molécula única em tempo real (SMRT).

serinas-protease: uma das quatro classes principais de proteases, apresentando um mecanismo de reação no qual um resíduo de Ser no sítio ativo atua como um catalisador covalente.

sgRNA: *Ver* RNA-guia único (sgRNA).

σ : (1) uma subunidade da RNA-polimerase bacteriana que confere especificidade para certos promotores; normalmente designada por um sobrescrito indicando seu tamanho (p. ex., σ^{70} tem um peso molecular de 70.000). (2) *Ver* densidade super-helicoidal (σ).

simbiontes: dois ou mais organismos mutuamente interdependentes; em geral, vivem em associação física.

simporte: cotransporte de solutos, no mesmo sentido, através de uma membrana.

sindecano: um proteoglicano com um único domínio transmembrana e um domínio extracelular que liga entre três e cinco cadeias de heparan-sulfato e, em alguns casos, condroitin-sulfato.

síndrome metabólica: uma combinação de condições médicas que, em conjunto, predis põem o indivíduo a doenças cardiovasculares e a diabetes tipo 2; incluem alta pressão arterial, altas concentrações de LDL e triacilgliceróis no sangue, glicemia no jejum ligeiramente elevada e obesidade.

sintases: enzimas que catalisam reações de condensação e que não requerem nucleosídeo-trifosfato como fonte de energia.

sintenia: ordem gênica conservada entre os cromossomos de espécies diferentes.

sintetases: enzimas que catalisam reações de condensação e usam ATP ou outro nucleosídeo-trifosfato como fonte de energia.

sistema: coleção isolada de matéria; toda matéria no universo que não faz parte do sistema é chamada de ambiente.

sistema aberto: sistema que troca matéria e energia com o meio. *Ver também* sistema.

sistema fechado: sistema que não troca nem matéria nem energia com o ambiente. *Ver também* sistema.

sistema multienzimático: grupo de enzimas relacionadas que participam de uma dada via metabólica.

sistemas binários: sistemas de transdução de sinal de bactérias e plantas; compostos por um receptor His-cinase que fosforila um resíduo interno de His quando ativado por seu ligante e, então, catalisa a fosforilação de um regulador de resposta, o qual altera sinais de saída do sistema de sinalização.

sítio alostérico: sítio específico na superfície de uma proteína alostérica, ao qual se liga a molécula do modulador ou efetor.

sítio ativo: a região da superfície da enzima à qual se liga a molécula do substrato e que o transforma cataliticamente; também conhecido como sítio catalítico.

sítio catalítico: *Ver* sítio ativo.

sítio de ligação: a fenda ou sulco na superfície de uma proteína na qual o ligante interage.

SNP: *Ver* polimorfismo de nucleotídeo único (SNP).

solução molar: um mol de soluto dissolvido em água, dando um volume final total de 1.000 mL.

Southern blot: procedimento de hibridização de DNA, no qual um ou mais fragmentos específicos são detectados em uma população maior por hibridização com uma sonda de ácido nucleico complementar marcada.

splicing: *Ver* splicing de RNA.

splicing alternativo: processo no qual éxons não consecutivos são cortados do transcrito primário e unidos seletivamente de maneiras alternativas, de modo a gerar diferentes RNA mensageiros maduros.

splicing de RNA: remoção de íntrons e junção de éxons em um transcrito primário.

SPM: *Ver* mediador especializado na pró-resolução (SPM).

STR: *Ver* repetições curtas em tandem (STR).

substituição conservativa: substituição de um resíduo de aminoácido em um polipeptídeo por outro resíduo com propriedades semelhantes; por exemplo, substituição de Glu por Asp.

substrato: o composto específico sobre o qual uma enzima age.

sulfonilureia (fármacos): grupo de medicamentos usados via oral no tratamento do diabetes tipo 2; atua fechando os canais de K^+ nas células β -pancreáticas, estimulando a secreção de insulina.

superfamília Ras das proteínas G: pequenas proteínas monoméricas ($M_r \sim 20.000$) que ligam nucleotídeos da guanosina; regulam vias de sinalização e de tráfego em membranas; são inativas quando ligadas ao GDP e são ativadas pelo deslocamento do GDP pelo GTP; inativadas por sua atividade GTPásica intrínseca. Também chamadas de proteínas G pequenas.

supertorção: a torção de uma molécula helicoidal (espiralada) sobre si mesma; uma espiral enrolada.

supertorção do DNA: a torção do DNA sobre si mesmo, geralmente como resultado de dobra, subenrolamento ou superenrolamento da hélice do DNA.

supressor sem sentido: mutação, geralmente no gene para um tRNA, que faz um aminoácido ser inserido em um polipeptídeo em resposta a um códon de término.

Svedberg (S): unidade de medida da velocidade de sedimentação de uma partícula em um campo centrífugo.

t

tag: um segmento extra de proteína que é ligado a uma proteína de interesse pela modificação de seu gene, em geral para propósito de purificação.

TAM: *Ver* tecido adiposo marrom (TAM).

tampão: sistema capaz de resistir a mudanças de pH, consistindo em um par acidobase conjugado, no qual a proporção entre o aceptor e o doador de prótons é próxima da unidade.

taxa metabólica basal: taxa de consumo de oxigênio de um animal em repouso completo, muito tempo depois de uma refeição.

tecido adiposo: tecido conectivo especializado no armazenamento de grandes quantidades

de triacilgliceróis. *Ver também* tecido adiposo bege; tecido adiposo marrom (TAM); tecido adiposo branco (TAB).

tecido adiposo bege: tecido adiposo termogênico, ativado pela diminuição da temperatura do indivíduo; expressa quantidades altas da proteína desacopladora UCP1 (termogenina). *Comparar com* tecido adiposo marrom (TAM); tecido adiposo branco (TAB).

tecido adiposo branco (TAB): tecido adiposo não termogênico rico em triacilgliceróis armazenados e que são mobilizados em resposta a sinais hormonais. A transferência de elétrons na cadeia respiratória das mitocôndrias do TAB está fortemente acoplada à síntese de ATP. *Comparar com* tecido adiposo bege; tecido adiposo marrom (TAM).

tecido adiposo marrom (TAM): tecido adiposo termogênico rico em mitocôndrias que contém a proteína desacopladora termogenina (UCP1), a qual desacopla a transferência de elétrons pela cadeia respiratória da síntese de ATP. *Comparar com* tecido adiposo bege; tecido adiposo branco (TAB).

tecnologias de sequenciamento de DNA: conjunto de tecnologias automatizadas modernas em rápido desenvolvimento que permitem um sequenciamento rápido e barato do DNA, desde partes de genes unitários a genomas inteiros. *Ver* sequenciamento por semicondutor iônico; piossequenciamento; sequenciamento por terminadores reversíveis; sequenciamento de Sanger; sequenciamento de molécula única em tempo real (SMRT).

telômero: estrutura especializada nos ácidos nucleicos nas extremidades de cromossomos eucarióticos lineares.

teoria quimiosmótica: a teoria de que a energia derivada das reações de transferência de elétrons é temporariamente armazenada como uma diferença transmembrana de carga e de pH, a qual, logo após, impulsiona a formação de ATP na fosforilação oxidativa e na fotofosforilação.

terminal do iniciador: a extremidade de um iniciador à qual são adicionadas as subunidades monoméricas.

termogênese: a geração biológica de calor pela atividade muscular (tremor), pela fosforilação oxidativa desacoplada ou pela ação de ciclos de substrato (fúteis).

termogenina: *Ver* proteína desacopladora 1 (UCP1).

território cromossômico: região do núcleo preferencialmente ocupada por um determinado cromossomo.

teste de Ames: teste bacteriano simples de carcinogenicidade, com base na suposição de que os carcinógenos são mutagênicos.

tetra-hidrobiopterina: a forma de coenzima reduzida da bipterina.

tetra-hidrolato: a forma de coenzima ativa, reduzida, da vitamina folato.

tiamina-pirofosfato (TPP): a forma de coenzima ativa da vitamina B₃; envolvida nas reações de transferência de aldeídos.

tiazolidinedionas: uma classe de medicamentos utilizados no tratamento do diabetes tipo 2; atuam reduzindo o nível de ácidos graxos circulantes e aumentando a sensibilidade à insulina. Também conhecidas como glitazonas.

tilacoide: um sistema fechado e contínuo de discos achatados, formados pelas membranas internas dos cloroplastos contendo pigmentos.

tioéster: um éster de um ácido carboxílico com um tiol ou mercaptana.

tipo selvagem: o genótipo ou o fenótipo normal (não mutado).

tocopherol: qualquer uma das diversas formas da vitamina E.

topoisomerases: enzimas que introduzem super-torções positivas ou negativas em DNA dúplice circulares fechados.

topoisômeros: formas diferentes de uma molécula de DNA circular fechado covalentemente, que difere apenas no seu número de ligação.

topologia: o estudo das propriedades de um objeto que não se alteram sob deformação contínua, como torção ou flexão.

TPP: *Ver* tiamina-pirofosfato (TPP).

tracrRNA: *Ver* CRISPR RNA de ativação em *trans* (tracrRNA).

tradução: o processo no qual a informação genética presente em uma molécula de mRNA especifica a sequência de aminoácidos durante a síntese proteica.

transaminação: transferência enzimática de um grupo amina de um α -aminoácido para um α -cetoácido.

transaminases: *Ver* aminotransferases.

transcrição: o processo enzimático pelo qual a informação genética contida em uma fita de DNA é usada para especificar a sequência complementar de bases em uma cadeia de mRNA.

transcriptase reversa: uma DNA-polimerase controlada por RNA nos retrovírus; capaz de fazer um DNA complementar a um RNA.

transcriptoma: o conjunto completo de transcritos de RNA presentes em uma dada célula ou tecido sob condições específicas.

transcrito primário: o primeiro RNA produto da transcrição antes de qualquer reação de processamento pós-transcricional.

transdução: (1) em geral, a conversão de energia ou da informação de uma forma em outra. (2) A transferência da informação genética de uma célula a outra através de um vetor viral.

transdução de sinal: o processo pelo qual um sinal extracelular (químico, mecânico ou elétrico) é amplificado e convertido em uma resposta celular.

transferase terminal: enzima que catalisa a adição de resíduos de nucleotídeos de um único tipo na extremidade 3' da cadeia de DNA.

transferência de elétrons: movimento dos elétrons do doador para o aceptor de elétrons; principalmente dos substratos ao oxigênio por meio dos carreadores da cadeia respiratória (de transporte de elétrons).

transferência de energia por ressonância de fluorescência: *Ver* FRET (transferência de energia por ressonância de fluorescência).

transformação: introdução de um DNA exógeno em uma célula, fazendo a célula adquirir um novo fenótipo.

transgênico: descreve um organismo que tem genes de outro organismo incorporados em seu genoma como resultado do uso de DNA recombinante.

translocase: uma enzima que causa movimento, como o movimento de um ribossomo ao longo de um mRNA.

transpiração: passagem da água das raízes da planta para a atmosfera pelo sistema vascular e pelos estômatos das folhas.

transportador ativo: proteína de membrana que move um soluto através da membrana contra um gradiente químico ou eletroquímico em uma reação que requer energia.

transportador passivo: uma proteína de membrana que aumenta a taxa de movimento de um soluto através da membrana a favor de seu gradiente eletroquímico, sem necessidade de adição de energia.

transportadores: proteínas que se estendem, atravessando a membrana, e transportam nutrientes, metabólitos, íons ou proteínas específicas por ela; às vezes chamados de permeases.

transportadores ABC: proteínas de membrana plasmática com sequências que formam casetes, aos quais o ATP se liga; servem para transportar para fora da célula uma grande variedade de substratos, incluindo íons inorgânicos, lipídeos e fármacos apolares, usando o ATP como fonte de energia.

transportadores de múltiplos fármacos: transportadores de membrana plasmática da família dos transportadores ABC que removem da célula vários fármacos comumente usados como antitumorais, interferindo, dessa forma, na terapia antitumoral.

transporte através da membrana: deslocamento de um soluto polar através de uma membrana por meio de uma proteína específica de membrana (um transportador).

transposição: o movimento de um gene ou de um conjunto de genes de um local para outro no genoma.

transposição de DNA: *Ver* transposição.

transposon (elemento de transposição): segmento de DNA que pode se mover no genoma de uma posição para outra.

triacilglicerol: éster de glicerol com três moléculas de ácido graxo; também chamado de triglicerídeo ou gordura neutra.

triose: açúcar simples com um esqueleto contendo três átomos de carbono.

tRNA: *Ver* RNA transportador (tRNA).

trombócitos: *Ver* plaquetas.

tromboxano: membro de uma classe de lipídeos eicosanoides com um anel de seis membros contendo um éter; envolvidos na agregação plaquetária durante a coagulação sanguínea.

t-SNARE: receptores proteicos em uma membrana-alvo (geralmente a membrana plasmática) que se ligam a v-SNARE na membrana de uma vesícula secretora e medeiam a fusão da vesícula com a membrana-alvo.

U

ubiquitina: pequena proteína de eucariotos, altamente conservada, que conduz proteínas intracelulares aos proteassomos para degradação. Várias moléculas de ubiquitina em tandem se unem covalentemente a um resíduo de Lys da proteína-alvo por ação de uma enzima específica de ubiquitinação.

união de extremidades não homólogas (NHEJ): processo no qual uma quebra na dupla-fita em um cromossomo é reparada por processamento e ligação das extremidades, muitas vezes criando mutações no sítio de ligação.

uniporte: sistema de transporte que transporta somente um soluto, diferente do cotransporte.

ureotélico: organismo que excreta o excesso de nitrogênio amínico na forma de ureia.

uricotélico: organismo que excreta o excesso de nitrogênio na forma de urato (ácido úrico).

V

variação de energia livre (ΔG): a quantidade de energia livre liberada (ΔG negativo) ou absorvida (ΔG positivo) em uma reação em temperatura e pressão constantes.

variação de energia livre padrão (ΔG°): a variação de energia livre para uma reação que ocorre em determinadas condições-padrão: temperatura, 298 K; pressão, 1 atm (101,3 kPa); e as concentrações de todos os solutos em 1 M. ΔG° denota a variação de energia livre padrão em pH 7,0 em 55,5 M de água.

variação de entalpia (ΔH): para uma reação, é aproximadamente igual à diferença entre a energia usada para romper as ligações e a energia ganha pela formação de novas.

vesícula: partícula pequena, esférica e envolta por membrana com um compartimento interno aquoso que contém componentes, como hormônios ou neurotransmissores, para se-

rem transportados dentro da célula ou para fora dela.

vetor: molécula de DNA que se replica autonomamente em uma célula hospedeira e à qual se pode juntar um segmento de DNA, de modo que este possa ser replicado na célula; por exemplo, um plasmídeo ou um cromossomo artificial.

vetor de expressão: um vetor que incorpora sequências que permitem a transcrição e a tradução de um gene clonado. *Ver* vetor.

vetor de transferência: vetor de DNA recombinante que pode ser replicado em duas ou mais espécies hospedeiras diferentes. *Ver também* vetor.

vetor viral: DNA viral alterado de forma a atuar como vetor de DNA recombinante.

vetorial: descreve uma reação enzimática ou um processo de transporte no qual a proteína tem uma orientação específica em uma membrana biológica tal que o substrato é deslocado de um lado da membrana para o outro à medida que é convertido em produto.

via anfibólica: via metabólica usada tanto no anabolismo como no catabolismo.

via C₄: via metabólica na qual uma molécula de CO₂ é adicionada inicialmente ao fosfoenolpiruvato pela enzima PEP-carboxilase, produzindo um composto de quatro carbonos dentro de células do mesófilo, que, posteriormente, será transportado para células da bainha do feixe vascular, onde o CO₂ é liberado para uso no ciclo de Calvin.

via das hexoses-monofosfato: *Ver* via das pentoses-fosfato.

via das pentoses-fosfato: via presente na maioria dos organismos que serve para interconverter hexoses e pentoses, sendo uma fonte de equivalentes de redução (NADPH) e de pentoses para processos biossintéticos; inicia com a glicose-6-fosfato e inclui o 6-fosfogliconato como um intermediário. Também chamada de via do fosfogliconato e via das hexoses-monofosfato.

via de novo: via de síntese de uma molécula, como um nucleotídeo, a partir dos precursores simples; diferente da via de recuperação.

via de recuperação: via de síntese de uma biomolécula, como um nucleotídeo, a partir de intermediários da via de degradação dessa biomolécula; via de reciclagem, diferente de uma via *de novo*.

via do fosfogliconato: *Ver* via das pentoses-fosfato.

via do glicolato: a via metabólica dos organismos fotossintéticos que converte o glicolato, produzido durante a fotorrespiração, em 3-fosfoglicerato.

vírion: uma partícula de vírus.

vírus: complexo proteína-ácido nucleico, autorreplicativo e infeccioso, que necessita de uma célula hospedeira intacta para sua replicação; seu genoma é DNA ou RNA.

vitamina: substância orgânica necessária em pequenas quantidades na dieta de algumas espécies; geralmente atua como componente de uma coenzima.

V_m : *Ver* potencial de membrana (V_m).

V_{max} : a velocidade máxima de uma reação enzimática quando o sítio de ligação está saturado com o substrato.

v-SNARE: receptores proteicos na membrana de uma vesícula secretora que se ligam a t-SNARE em uma membrana-alvo (geralmente a membrana plasmática) e medeiam a fusão da vesícula com a membrana.

W

Western blot: *Ver* imunoblot.

Z

zimogênio: precursor inativo de uma enzima; por exemplo, o pepsinogênio, o precursor da pepsina.

zíper de leucina: motivo proteico estrutural envolvido em interações proteína-proteína em muitas proteínas de regulação eucarióticas; consiste na interação de duas α -hélices, na qual os resíduos de leucina a cada sétima posição são pontos salientes conspicuos nas superfícies que interagem.

zwitteríon: íon bipolar com cargas positivas e negativas separadas espacialmente.

Sobre o Grupo A

O Grupo A está preparado para ajudar pessoas e instituições a encontrarem respostas para os desafios da educação. Estudantes, professores, médicos, engenheiros, psicólogos. Profissionais das carreiras que ainda não têm nome. Universidades, escolas, hospitais e empresas das mais diferentes áreas. O Grupo A está ao lado de cada um. E também está nas suas mãos. Nos seus conteúdos virtuais. E no lugar mais importante: nas suas mentes.

Acesse

0800 703 3444
sac@grupoa.com.br
Av. Jerônimo de Ornelas, 670
Santana
CEP: 90040-340 • Porto Alegre / RS

